ZUM MECHANISMUS DER INAKTIVIERUNG DES FAKTORS X_A (STUART-PROWER) DURCH DAS PROGRESSIVE ANTITHROMBIN UND DEN ANTITHROMBIN-HEPARIN-KOMPLEX

VON
THOMAS WÜST

1982

Diss. Düsseldorf

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für
Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H. T. Brüster

ZUM MECHANISMUS DER INAKTIVIERUNG DES FAKTORS X_A (STUART-PROWER) DURCH DAS PROGRESSIVE ANTITHROMBIN UND DEN ANTITHROMBIN-HEPARIN-KOMPLEX

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Thomas Wüst
1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. G. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. H. Trobisch

Korreferent
gez.: Prof. Dr. F. K. Ohnesorge

Meinem hochverehrten Lehrer
Herrn Privatdozent Dr. med. Heiner Trobisch
möchte ich für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse, seine fördernden Anregungen und seine mir stets gewährte freundliche Unterstützung meinen aufrichtigen Dank sagen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535716_0065

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Historische Obersicht	1
1.2	Obersicht über die Stellung von Faktor X_a, Antithrombin III und Heparin im Gerinnungssystem	3
1.3	Faktor X; biophysikalische Daten	5
1.4	Chromogene Peptidsubstrate; Entwicklung und Biochemie	8
1.5	Antithrombin III; biophysikalische Daten	9
1.6	Heparin; biophysikalische Daten	10
1.7	Fragestellung der Arbeit	11
2.	Material	12
3.	Methoden	13
3.1	Versuchsaufbau	13
3.2	Puffer	14
3.3	Ermittlung des mikromolaren Extinktionskoeffizienten für pNA	14
3.4	Prüfung des Substratumsatzes auf linearproportionale Abhängigkeit von verschiedenen Enzymkonzentrationen	14
3.5	Ermittlung des Substratumsatzes im System S 2222- Faktor X_a	14
3.6	Zeitabhängige Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III	15
3.7	Zeitabhängige Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex	15
3.8	Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III in Gegenwart von S 2222	15
3.9	Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex in Gegenwart von S 2222	16
3.10	Zeitabhängigkeit der Antithrombin III-Heparin-Wechselwirkung	16
3.11	Wirkung von Heparin auf die Faktor X_a-Aktivität	17
3.12	Hemmung von Faktor X_a durch EDTA-Plasma in Gegenwart von S 2222	17

3.13	Mathematisch-graphische Verfahren	17
3.13.1	Verfahren nach LINEWEAVER-BURK zur Ermittlung von K_M und v_{max}	17
3.13.2	Bestimmung der Inhibitorkonstanten (K_i) nach DIXON	18
4.	Befunde	20
4.1	Ermittlung des mikromolaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\mu mol}$ für p-NA	20
4.2	Linear-proportionale Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Enzymkonzentration	20
4.3	Ermittlung der kinetischen Konstanten K_M und v_{max}	22
4.4	Zeitabhängige Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III	29
4.5	Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex als Funktion der Zeit	35
4.6	Zeitabhängigkeit der AT III-Heparin-Wechselwirkung	39
4.7	Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III in Gegenwart von S 2222	40
4.8	Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex in Gegenwart von S 2222	44
4.9	Wirkung von Heparin auf die Faktor X_a-Aktivität	60
5.	Ergebnisse und Diskussion	64
6.	Zusammenfassung	83
7.	Literatur	85

Verzeichnis der Abkürzungen

AT III	Antithrombin III
F X	Faktor X
$F X_a$	Aktivierter Faktor X
Hep	Heparin
U AT III	Internationale Einheit AT III; entspricht der Menge AT III, die in 1 ml Citratplasma enthalten ist (Def. gem. WHO)
U Hep	Internationale Einheit Heparin; entspricht der spezifischen Wirkung von 7.7 µg des Internationalen Standardpräparates
nkat	Nanokatal; die Menge eines Enzyms, welche die Umwandlung von einem nmol Substrat pro Sekunde katalysiert
v	Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
K_M	MICHAELIS-Konstante; Substratkonzentration, bei der $v = v_{max}/2$ ist
K_i	Inhibitorkonstante; Dissoziationskonstante der Reaktion $E + I \rightleftarrows EI$
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
S	Substratkonzentration
WZ	Wechselzahl
s	Standardabweichung
VK	Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)
nd	nicht durchgeführt

1. Einleitung

1.1 Historische Obersicht

Die Entdeckung eines gerinnungshemmenden Prinzips im Blut begann bereits im Jahre 1880 mit den Untersuchungen von SCHMIDT-MÜHLHEIM über "Peptone und ihre physiologischen Funktionen". Er fand, daß nach intravenöser Injektion von WITTE-Pepton das Blut von Hunden gerinnungsunfähig wurde (16).

GLEY und PACHON (17, 18) zeigten 1895, daß nach Hepatektomie die spezifische Wirkung der Peptone auf die Blutgerinnung des Hundes ausblieb.

1896 fand DELEZENNE (19), daß nach Perfusion der Leber mit 1 % WITTE-Pepton-Salzlösung das Antikoagulans aus der Leber isoliert werden konnte.

In Unkenntnis der deutschen und französischen Arbeiten fand Mc LEAN (20) 1916 in der Hundeleber eine gerinnungshemmende Substanz, die von HOWELL und HOLT 1918 (3) nach ihrem Ursprungsort als Heparin bezeichnet wurde.

1924 konnte HOWELL zeigen, daß das während des Peptonschocks aus der Leber freigesetzte Antikoagulans mit Heparin identisch ist (21).

1939 zeigten BRINKHOUSE et al. (4), daß Heparin zur Hemmung der Prothrombinaktivierung einen weiteren Plasmafaktor benötigt. Ohne Heparin zeigte dieser Plasmafaktor eine nur geringe Antithrombinwirkung.

In der Folgezeit wurde "das" Antithrombin weiter spezifiziert (5):

1. Antithrombin I bezeichnet die Absorption kleiner Mengen Thrombin an das Fibringerinnsel.

2. Unter Antithrombin II versteht man den zur Heparinwirkung erforderlichen Kofaktor des Plasmas.

3. Antithrombin III bezieht sich auf die progressive Inaktivierung von Thrombin durch ein Plasmaprotein.

4. Antithrombin IV beschreibt einen nicht näher geklärten Effekt der Vernichtung von Thrombin sofort im Anschluß an seine Bildung aus Prothrombin.

5. Antithrombin V ist die Bezeichnung für ein Immunglobulin, das die Aggregation von Fibrinmonomeren verhindert.

6. Antithrombin VI ist identisch mit den hochmolekularen Fibrinspaltprodukten.

MONKHOUSE et al. (5) zeigten 1955, daß die Funktion von Antithrombin II und Antithrombin III durch das gleiche Molekül erfüllt wird.

In der internationalen Literatur spricht man heute nur noch von Antithrombin III, worunter der Effekt der progressiven Inhibitation als auch die Heparinkofaktorwirkung subsummiert werden.

1962 postulierten SEEGERS und MARCINIAK (6) eine Komplexbildung zwischen Thrombin und Antithrombin III. YIN et al. zeigten 1971 die Hemmbarkeit von Faktor X_a durch Antithrombin III sowie die Möglichkeit der Beschleunigung der Inhibition durch Heparin (7).

ROSENBERG und DAMUS (8) wiesen 1973 in einer grundlegenden Arbeit nach, daß Antithrombin III mit Thrombin einen äquimolaren, nicht dissoziierenden Komplex bildet und daß Heparin diese Reaktion signifikant beschleunigt.

Vergleichbare Ergebnisse wurden in der Folgezeit für die Faktoren IX_a, X_a und XI_a sowie für das Plasmin erzielt (9, 10, 11, 12).

1.2 Obersicht über die Stellung von Faktor X_a, Antithrombin III und Heparin im Gerinnungssystem

Faktor X kann sowohl auf endogenem als auch auf exogenem Weg aktiviert werden.

Das exogene Gerinnungssystem wird durch das Gewebsthromboplastin (F III), das bei einer Verletzung freigesetzt wird, initiiert. In einer nichtenzymatischen Reaktion wird durch Faktor III der Gerinnungsfaktor VII aktiviert. F VII_a wird durch Kalziumionen an Phospholipidmizellen fixiert und hydrolysiert in einer Folgereaktion Faktor X partiell, der dabei etwa 50 % seines Molekulargewichtes verliert und aktiviert wird.

Der durch Kontakt mit hydrophoben Gruppen in seine aktive Form überführte HAGEMANN-Faktor (F XII_a) aktiviert F XI, wodurch das endogene Gerinnungssystem gestartet wird. Faktor XI_a aktiviert F IX. Faktor IX_a bildet in Gegenwart von Kalziumionen und Phospholipidmizellen mit dem Faktor VIII zusammen den endogenen Aktivator des Faktors X.

Der aktivierte Faktor X wird über Kalziumionen an Phospholipidmizellen fixiert. Zusammen mit dem ebenfalls angelagerten Faktor V bildet er den Prothrombinaktivator.

In der sich anschließenden Reaktion wird das Prothrombinmolekül über Kalziumionen an den Faktor V adsorbiert, wodurch sich definierte Aminosäurensequenzen des Prothrombinmoleküls dem aktiven Zentrum des Faktors X_a zukehren. Dieser spaltet dann an zwei spezifischen Aminosäurensequenzen das Prothrombinmolekül; das dabei entstehende Intermediärprodukt II wird in einer zweiten partiellen Hydrolyse durch Faktor X_a zum Thrombin aktiviert.

Die Endopeptidase Thrombin spaltet vom aminoterminalen Ende des Fibrinogenmoleküls vier Peptide ab. Je nach Zugehörigkeit zu den Ketten des Fibrinogenmoleküls unterscheidet man zwei Fibrinopeptide A, die von den α-Ketten, und zwei Peptide B, die von den ß-Ketten des Fibrinogens abgespalten werden.

Die hierdurch entstehenden Monomere aggregieren im wässrigen Milieu spontan. Sie bilden lange Stränge, die sich zu einem Doppelstrang aneinanderlagern; je zwei Doppelstränge bilden durch laterale Aggregation die Fibrinfibrille. Dieses noch instabile Gerüst wird durch den Gerinnungsfaktor XIII, der ebenfalls durch Thrombin in seine aktive Form überführt wird, kovalent vernetzt.

Mit dem Prozeß der Fibrinvernetzung ist die Blutgerinnung abgeschlossen (57).

Antithrombin III ist der Hauptinhibitor der aktivierten Gerinnungsfaktoren und daher von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichtes der Gerinnung. Die Geschwindigkeit der Inhibition der aktivierten Gerinnungsfaktoren durch Antithrombin III wird durch Heparin signifikant beschleunigt. Die Antithrombin III - Heparin - Komplexe greifen hemmend auf den Ebenen der Faktor X-Aktivierung, der Faktor X_a-Wirkung sowie der Thrombinwirkung an (22).

Abbildung 1 zeigt zusammenfassend den Ablauf der Gerinnung sowie die durch Antithrombin III - Heparin - Komplexe blockierten Reaktionen.

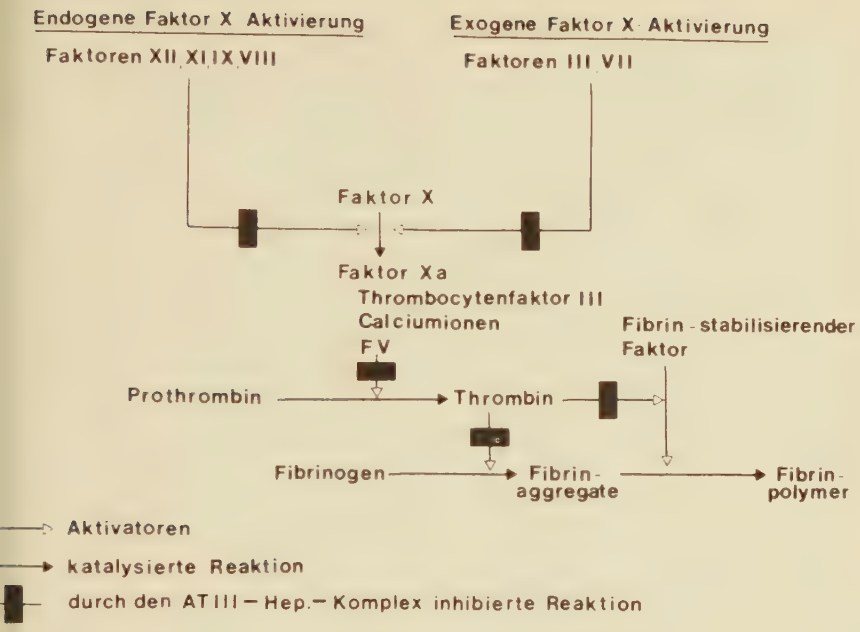


Abb. 1: Durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex blockierte Reaktionen des Gerinnungssystems

1.3 Faktor X; biophysikalische Daten

F X_a zählt zusammen mit den aktivierten Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, XI und XII sowie dem Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin und Akrosin zu der Familie der Serylproteasen (28).

Boviner Faktor X hat eine molare Masse von 55.000 Daltons (23, 24, 25) und besteht aus einer Peptidkette, die durch Disulfidbrücken stabilisiert ist. Der durch partielle Hydrolyse aktivierte Faktor X hat nur noch eine molare Masse von 34.000 Daltons (60). Neuere verteilungschromatographische Untersuchungen (58) weisen allerdings darauf hin, daß boviner Faktor X_a eine molare Masse von 61.000 Daltons hat.

Humaner Faktor X hat eine molare Masse von 75.000 Daltons (59), die von humanem Faktor X_a ist nicht genau bekannt.

Serin im aktiven Zentrum hat den Serylproteasen ihren Namen gegeben. Die Hydroxymethylgruppe des Serins fungiert als Protonenrelais bei der Peptidhydrolyse (27). Initial richten geladene Seitenketten (Asparagin, Histidin) die Hydroxymethylgruppe des Serins auf die zu spaltende Peptidbindung aus. Man bezeichnet Asparagin und Histidin deswegen als tentative Aminosäuren des aktiven Zentrums.

Danach wird eine Acylbindung zwischen dem Serylrest des Enzyms und der Carbamylgruppe des Substrates geknüpft. Hierbei wird ein energiereicher Zwischenzustand erreicht, der als tetraedrische Transformation der Carbamylgruppe bezeichnet wird (MICHAELIS-Komplex).

Dieser unstabile Zustand wird aufgelöst, indem ein Proton vom Serylrest des Enzyms auf die Aminogruppe der Peptidbindung übertragen wird, wodurch gleichzeitig das erste hydrolytische Produkt abgeworfen wird.

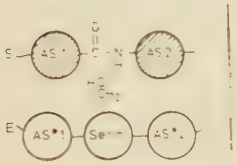
Das Enzym bleibt zunächst noch durch eine Acylbindung mit der Carboxylgruppe des Restsubstrates verbunden. Dieser Enzym-Substrat-Ester wird durch Hydroxylierung und Reprotonisierung des Enzyms gespalten, wodurch das hydrolytische Produkt 2 abgeworfen wird und die Protease für eine erneute Spaltung zur Verfügung steht (28, 29).

Dieser Mechanismus der Peptidhydrolyse durch Serylproteasen ist in Abbildung 2 dargestellt.

Entsprechend spaltet Faktor X_a sein natürliches Substrat Prothrombin.

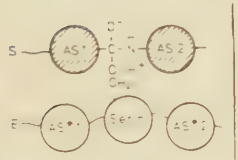
Diese Spaltung kann zur Konzentrationsbestimmung von Faktor X_a verwendet werden; allerdings muß dann die Fibrinbildung durch Thrombin als Indikatorreaktion angeschlossen werden.

Einfacher und genauer ist eine Bestimmung der Faktor X_a-Konzentration durch die Verwendung von Kunstsubstraten möglich. Hier spielen die chromogenen Peptidsubstrate eine besondere Rolle.



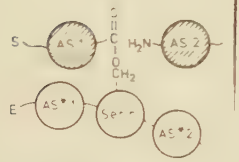
Vermittelt durch elektrostatische Kräfte nähert sich das Enzym dem Substrat.

E + S



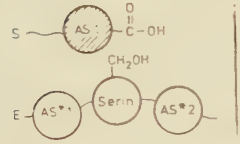
Tentative Aminosäuren richten die Hydroxymethylgruppe der Aminosäure Serin auf die zu spaltende Peptidbindung. Aktivierung der Carbamylgruppe durch die tetraedrische Transformation.

(E : S) MICHAELIS-Komplex



Bildung einer Acylbindung zwischen Substrat und Enzym. Abwurf des ersten hydrolytischen Produktes.

(E : S') + P_1



Durch Rehydroxylierung des Substrates und Reprotonisierung des Enzyms wird der ES-Komplex deacyliert.

E + P_2

Abb. 2: Die Mechanismen der Peptidhydrolyse durch Serylproteasen. E = Enzym; S = Substrat; P_1 = hydrolytisches Produkt 1; P_2 = hydrolytisches Produkt 2

1.4 Chromogene Peptidsubstrate; Entwicklung und Biochemie

Das von uns verwendete mit einem Chromogen markierte Tetrapeptid S 2222 ist ein typischer Vertreter dieser Substanzgruppe, deren Geschichte damit begann, daß ERLANGER (36) im Jahre 1961 einen para-Nitranilinrest an das Carboxyterminale von Benzoylarginin durch eine Säureamidbindung fixierte. Dieses einfache Substrat wurde durch Serylproteasen gespalten, so daß p-Nitranilin frei wurde.

Die noch mangelhafte Spezifität der Substrate auf Monoaminosäurebasis konnte nach Aufklärung der Peptidsequenz der natürlichen Proteasensubstrate durch die Synthese analoger Peptide deutlich gebessert werden.

Abbildung 3 zeigt am Beispiel des S 2222 die Abspaltung des Chromophors p-Nitranilin durch Faktor X_a.

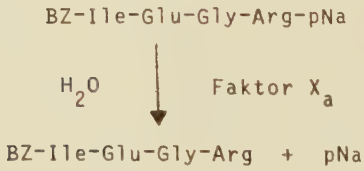


Abb. 3: Spaltung von S 2222 durch Faktor X_a

Die Konzentration des freigesetzten p-Nitranilin kann im Spektrallinienphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden. Dies ist möglich, da das peptidgebundene Chromophor bei dieser Wellenlänge praktisch keine Absorption aufweist, während das freie p-Nitranilin durch einen Extinktionsgipfel bei 382 nm charakterisiert ist (Abbildung 4).

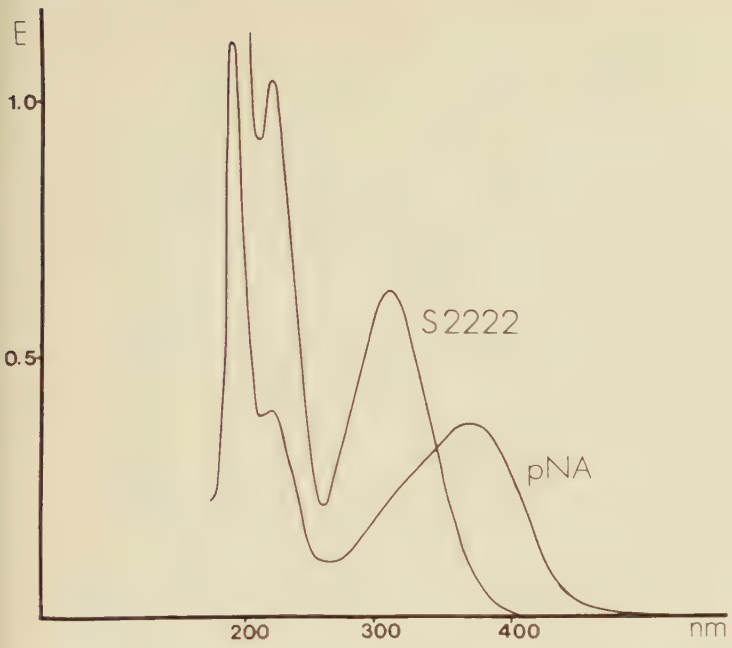


Abb. 4: Absorptionsspektren von S 2222 und p-Nitranilin

Die Konzentrationsänderung von p-Nitranilin pro Zeiteinheit (kinetische Bestimmungsmethode) ist ein direkter Parameter für die Enzymkonzentration.

1.5 Antithrombin III; biophysikalische Daten

Der Inhibitor Antithrombin III ist ein in der α_2-Globulinfraktion wanderndes Plasmaprotein mit einer Molekularmasse von etwa 64.000 Daltons (13).

AT III bildet einen unter physiologischen Bedingungen nicht dissoziierenden Komplex mit Serinproteasen. Zwar ist dies bisher vor allem am Beispiel des Thrombin gezeigt worden (8), jedoch ist diese Fähigkeit nicht auf das Thrombin beschränkt. Es können auch die aktivierten Gerinnungsfaktoren IX, X, XI

und XII sowie das Plasmin gleichartig gehemmt werden (9, 10, 11, 12, 29, 30).

Drei typische Merkmale der AT III-Enzym-Interaktion sind mit Hilfe klassischer Testverfahren bisher erarbeitet worden (8, 29):

1. Die Inhibitionsgeschwindigkeit ist gering, was in der Bezeichnung progressives Antithrombin zum Ausdruck gebracht wird.

2. Der Enzym-Inhibitor-Komplex dissoziiert unter physiologischen Bedingungen nicht.

3. Die Geschwindigkeit der Enzyminaktivierung wird durch Heparin beschleunigt.

1.6 Heparin; biophysikalische Daten

JORPES (19) wies 1935 nach, daß Heparin ein Polyschwefelsäureester eines Mucopolysaccharids ist. Er identifizierte den Aminozucker als Glucosamin. WOLFROM et al. zeigten 1961, daß der zweite Baustein D-Glucuronsäure ist (33). Neuere Untersuchungen von ROSENBERG erbrachten jedoch Hinweise dafür, daß die Glucuronsäure in "high-active"-Heparinen durch die stereoisomere D-Iduronsäure ersetzt ist (34).

Die Zahl der Sulfatgruppen innerhalb der 1,4-glykosidisch gebundenen Disaccharideinheit beträgt nach JORPES 2.5 - 3 (32), wobei eine Mischung von Di- und Trischwefelsäureestern angenommen wird. TROBISCH et al. fanden bei der Bausteinanalytik fünf verschiedener Mucosaheparinpräparationen (22) ein sehr konstantes S:C-Verhältnis, das 2.3 Sulfatreste pro Disaccharideinheit vermuten läßt.

Dies steht in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen von ROSENBERG (34), der als Grundbaustein des Heparins eine Tetrasaccharideinheit folgender Zusammensetzung fand:

L-Iduronsäure-N-acetyl-D-glucosamin-6-sulfat-D-glucuronsäure-N-sulfat-glucosamin-6-sulfat.

Das sechste Kohlenstoffatom im Glucosamin scheint regelmäßig sulfatiert, während die O-Sulfatierung der Uronsäuren keinem festen Prinzip folgt.

TROBISCH et al. fanden bei der Untersuchung von verschiedenen Mukosaheparinpräparationen unter der Verteilungschromatographie und Grenzwertviskosimetrie Molekularmassen von 8.000 bis 25.000 Daltons (22). Die untersuchten kommerziellen Heparinpräparationen zeigten in der Agarosegelelektrophorese Inhomogenitäten sowohl im Bereich der Banden selbst als auch durch das Erscheinen von Mehrfachbanden. Die Inhomogenitäten sind einerseits durch unterschiedliche Ladungen, andererseits auf die bereits oben beschriebene Uneinheitlichkeit der Molekularmasse zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, daß die Kettenlänge der Heparine von ausschlaggebender Bedeutung für ihre biologische Aktivität ist, wobei die Aktivität mit der Kettenlänge steigt (35).

1.7 Fragestellung der Arbeit

Exakte kinetische Daten der Wechselwirkung zwischen Faktor X_a, Antithrombin III und Heparin sind bisher nicht erhoben worden. Insbesondere blieb die Frage offen, ob das Antithrombin III die Serylproteasen im Sinne einer kompetitiven oder einer non-kompetitiven Inhibition inaktiviert.

AOKI et al. postulierten 1973 einen non-kompetitiven Mechanismus für die Inaktivierung von Thrombin durch AT III (31). Ebenso fanden KLASING et al. 1979 einen non-kompetitiven Hemmtyp für das System Faktor X_a-Antithrombin III.

ROSENBERG und DAMUS (8) konnten jedoch 1973 zeigen, daß die Inaktivierung der Serylproteasen durch eine Bindung des AT III unter Einbeziehung eines Arginylrestes im Inhibitor an das Serin im aktiven Zentrum der Proteasen erfolgt. Dies ist nicht nur als früher Hinweis auf eine Kompetition, sondern auch dafür zu werten, daß das AT III durch Faktor X_a an einer spezifischen Peptidsequenz gespalten wird, an der Arginin beteiligt ist.

Unter Verwendung von chromogenen Peptidsubstraten untersuchten wir daher:

1. die Kinetik der Spaltung des chromogenen Kunstsubstrates S 2222 durch bovinen Faktor X_a sowie den Einfluß bivalenter Kationen auf diese Reaktion,

2. den Typ der Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III und

3. den Einfluß von Heparin auf diese Hemmung sowie auf die Faktor X_a-Aktivität.

2. Material

2.1 ß-Alanin; reinst, pyrogenfrei; SERVA, Heidelberg

2.2 Kalziumlaktat; reinst; MERCK, Darmstadt

2.3 Natronlauge; 1 mol/l; MERCK, Darmstadt

2.4 Buffer solution; pH 7 +/- 0.01; RADIOMETER, Kopenhagen

2.5 Buffer solution; pH 4.01 +/- 0.01; CORNING MEDICAL, Halstead

2.6 S 2222; KABI, Stockholm

2.7 Faktor X_a; KABI, Stockholm

2.8 Antithrombin III; KABI, Stockholm

2.9 p-NA-Standardlösung 0.05 mmol/l; KABI, Stockholm

2.10 Heparin 5.000 I.E./ml; RIKER, Borken

2.11 Dimethylsulfoxid; MERCK, Darmstadt

3. Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Für sämtliche Versuche wurde grundsätzlich die gleiche Geräteanordnung verwendet.

Einem EPPENDORF- Spektrallinienphotometer (Typ 1101 M) wurde ein linearisierender Verstärker (Substratrechner F. VOGEL, Typ SR 734) nachgeschaltet, dessen Ausgangssignal durch einen Kompensationsschreiber (F. METRAWATT, Typ Servogor S) aufgezeichnet wurde.

Die Messungen erfolgten bei + 37°C. Sowohl die Substrate als auch die verwendeten Halbmikroküvetten wurden auf + 37°C erwärmt.

Nicht gelöstes S 2222, Antithrombin III und Faktor X_a wurden bei + 4°C gelagert. S 2222 wurde am Tag der Anwendung in aqua dest. mit Hilfe eines Ultrasonic-Gerätes (F. L & R, Typ T 7) gelöst. Eine längerfristige Lagerung im gelösten Zustand erfolgte nicht. Auch Faktor X_a wurde zur Vermeidung von Schaumbildung im Ultrasonic-Gerät gelöst. Abgesehen von den ersten Experimenten wurde an den Lösevorgang eine halbstündige Dialyse gegen aqua dest. und danach eine zwölfstündige Dialyse gegen ß-Alanin-Puffer (0.25 molar, pH 8.4) angeschlossen. Das Dialysat wurde anschließend flammenphotometrisch auf seinen Kalziumgehalt überprüft (Sollwert < 30 µmol/l), portioniert und bei -80°C gelagert. Antithrombin III wurde in aqua dest. im Ultrasonic-Gerät gelöst, aber anschließend 12 h ausschließlich gegen ß-

Alanin-Puffer (0.25 molar, pH 8.4) dialysiert. Auch dieses Dialysat wurde nach flammenphotometrischer Kontrolle der Kalziumkonzentration (Sollwert < 300 µmol/l) bei -80°C eingefroren.

3.2 Puffer

3.2.1 Puffer 1:β-Alanin 0.25 mol/l; pH 8.4

3.2.2 Puffer 2:β-Alanin 0.25 mol/l, Kalziumlaktat 0.025 mol/l; pH 8.4

3.3 Ermittlung des mikromolaren Extinktionskoeffizienten für pNA:

Die Extinktion einer 0.05 millimolaren pNA-Standardlösung wurde bei Hg 405 nm gemessen.

3.4 Prüfung des Substratumsatzes auf linear-proportionale Abhängigkeit von verschiedenen Enzymkonzentrationen

Prinzip: 300 µl S 2222 + 200 µl Puffer + 100 µl F X_a

Faktor X_a wurde in aqua dest. verdünnt.

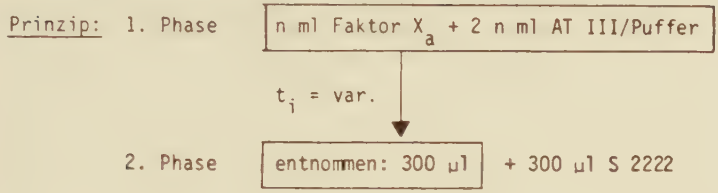
Bei allen in 3.4 bis 3.12 beschriebenen Versuchen wurde eine vollständige Durchmischung der im Test eingesetzten Substanzen durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen mit einer Hubkolbenpipette sichergestellt. Bei allen Versuchen wurde unmittelbar nach Start der Reaktion mit der pNA-Umsatzmessung begonnen.

3.5 Ermittlung des Substratumsatzes im System S 2222 - Faktor X_a

Prinzip: 300 µl S 2222 + 200 µl Puffer + 100 µl F X_a

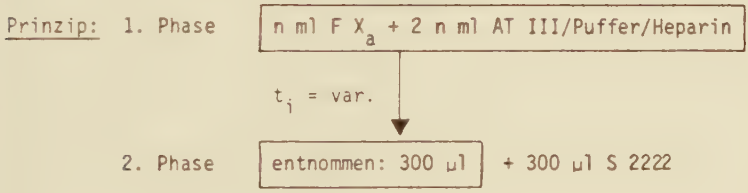
Die Konzentration von S 2222 wurde durch geometrische Verdünnung (1:2, 1:4 usw.) einer 4-millimolaren Stammlösung mit aqua dest. variiert. Die Faktor X_a-Konzentration wurde konstant gehalten.

3.6 Zeitabhängige Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III



Faktor X_a wurde mit in Puffer verdünntem Antithrombin III inkubiert (1. Phase). An aus diesem Ansatz entnommenen Aliquoten wurde die Faktor X_a-Restaktivität bei konstanter S 2222-Konzentration bestimmt (2. Phase).

3.7 Zeitabhängige Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex



Antithrombin III wurde mit Heparin aktiviert.

3.8 Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III in Gegenwart von S 2222

Prinzip: 1. Phase 300 µl S 2222 + 100 µl AT III + 100 µl Puffer

2. Phase + 100 µl Faktor X_a

Das System wurde nach Vorlage von Substrat, Inhibitor und Puffer (1. Phase) mit Faktor X_a gestartet (2. Phase). Abgesehen von den Vorversuchen wurde mit maximaler Geschwindigkeit des Schreibers gearbeitet (60 cm/Minute) und das Gerät bereits vor Reaktionsbeginn gestartet.

3.9 Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex in Gegenwart von S 2222

Prinzip: 1. Phase 300 µl S 2222 + 100 µl Puffer + 100 µl AT III/Hep

2. Phase + 100 µl Faktor X_a

Durch geometrische Verdünnung (1:2, 1:4 usw.) einer Antithrombin III-Heparin-Stammlösung mit Antithrombin III gleicher Konzentration konnte eine konstante AT III- bei wechselnder Heparinkonzentration erzielt werden.

Andererseits wurde durch Verdünnung der AT III-Heparin-Stammlösung mit Puffer eine wechselnde Antithrombin III-Konzentration bei konstantem Verhältnis AT III zu Heparin erreicht.

3.10 Zeitabhängigkeit der Antithrombin III-Heparin-Wechselwirkung

Prinzip: 1. Phase [Antithrombin III + Heparin]

t_i = var.

2. Phase [entnommen: 100 µl] + 300 µl S 2222 + 100 µl F X_a

AT III wurde mit Heparin vorinkubiert (1. Phase). Nach Mischung von aus diesem Gemisch entnommenen Aliquoten mit F X_a und S 2222 wurde die F X_a-Restaktivität gemessen (2. Phase).

3.11 Wirkung von Heparin auf die Faktor X_a-Aktivität

Prinzip: 300 µl S 2222 + 200 µl Puffer + 100 µl F X_a/Heparin

Eine Faktor X_a-Heparinstammlösung wurde mit Faktor X_a gleicher Konzentration verdünnt, so daß sich bei konstanter F X_a- eine wechselnde Heparin-Konzentration ergab.

3.12 Hemmung von Faktor X_a durch EDTA-Plasma in Gegenwart von S 2222

Prinzip: 1. Phase 300 µl S 2222 + 100 µl Puffer + 100 µl EDTA-Plasma

2. Phase + 100 µl Faktor X_a

Entspricht 3.8, jedoch wurde hochgereinigtes AT III durch das in humanem EDTA-Plasma enthaltenem AT III ersetzt.

3.13 Mathematisch-graphische Verfahren

3.13.1 Verfahren nach LINEWEAVER-BURK zur Ermittlung von K_M und v_{max} (62)

Das Verfahren der doppelt-reziproken Auftragung von Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 5) ermöglicht die Ermittlung der Maximalgeschwindigkeit (v_{max}) und der MICHAELIS-Konstanten (K_M) einer enzymatisch katalysierten Reaktion (1, 2)

Aus den Meßwerten wurde jeweils rechnerisch eine Regressionsgerade ermittelt.

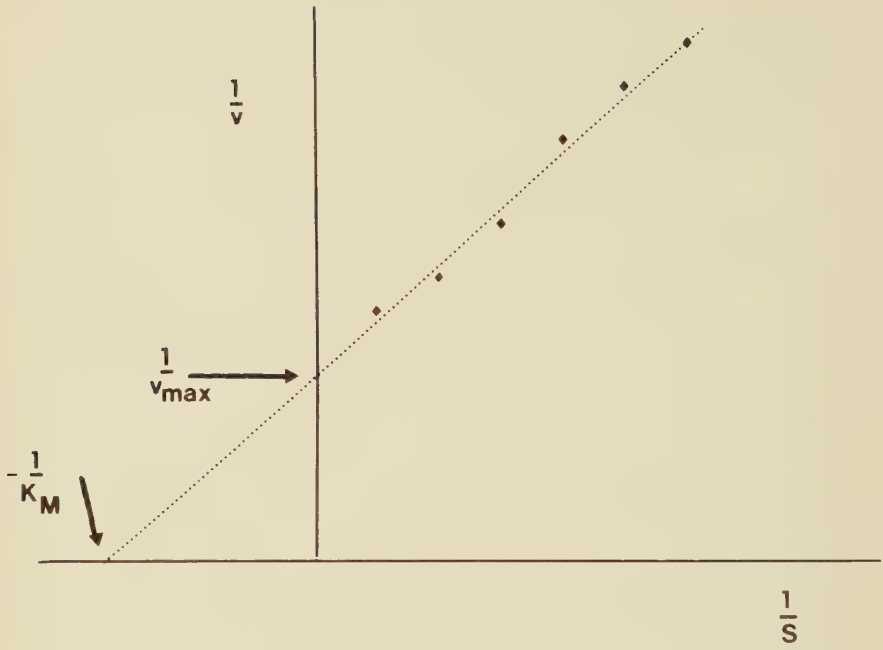


Abb. 5: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion von der Substratkonzentration in doppelt-reziproker Auftragung nach LINEWEAVER-BURK

3.13.2 Bestimmung der Inhibitorkonstanten (K_i) nach DIXON (63)

Es wird zunächst die Reaktionsgeschwindigkeit v für verschiedene Inhibitorkonzentrationen bei konstanten Substratkonzentrationen $S_{1,2...n}$ bestimmt.

Die Meßwerte werden in einem Koordinatensystem aufgetragen (Abbildung 6), wobei

Abszisse = Inhibitorkonzentration und Ordinate = $\frac{1}{v}$

gesetzt wird.

Im Fall einer reinen Verdrängungshemmung schneiden sich die resultierenden Geraden in einem Punkt (S) im linken oberen Quadranten. Dieser Punkt hat die Koordinaten

$$x = - K_i \text{ und } y = \frac{1}{v_{max}} \quad (2).$$

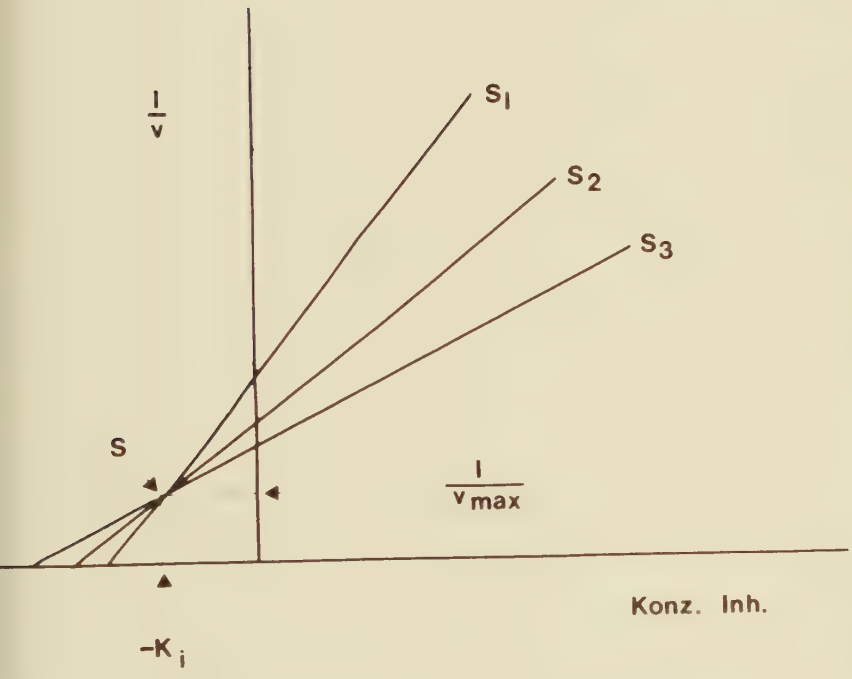


Abb. 6: Schematische Darstellung des DIXON-Diagramms

4. Befunde

4.1 Ermittlung des mikromolaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\mu mol}$ für p-NA

Methode siehe 3.3. Die Extinktion einer 0.05 millimolaren p-NA-Lösung beträgt 0.513. Der mikromolare Extinktionskoeffizient berechnet sich wie folgt (61):

$$\varepsilon_{\mu mol} = \frac{E}{c \cdot d} = \frac{0.513}{0.05 \cdot 1.0} = 10.26 \left[\frac{cm^2}{\mu mol} \right]$$

E = Extinktion
d = Schichtdicke [cm]
c = Konzentration [µmol/ml Meßlösung]

Die p-NA-Konzentration in der Probe berechnet sich nach RICK (15):

$$c_{Probe} = \frac{E \cdot V}{\varepsilon_{\mu mol} \cdot d \cdot v} = E \frac{V}{\varepsilon_{\mu mol} \, d \cdot v}$$

$$c^{pNA}_{Probe} = E \cdot \frac{0.6}{10.26 \cdot 0.3} = E \cdot 0.194 \left[\mu mol/ml \text{ Probe} \right]$$

V = Volumen der Meßlösung (ml)
v = Volumen der in den Test eingesetzten Probe (ml)

4.2 Linear-proportionale Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Enzymkonzentration.

Methode siehe 3.4. Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Enzymaktivität bei zwei Substratkonzentrationen. Enzymkonzentrationen und Substratumsatz sind einander linear-proportional korreliert; der Korrelationskoeffizient beträgt 0.999 (s. Abb. 7).

Tabelle 1: Substratumsatz (S 2222) in Abhängigkeit verschiedener Enzymaktivitäten (F X_a)

Enzymverd.	Substratumsatz [µmol/ml x min]	
	Substratkonz. 2 mmol/l	Substratkonz. 1 mmol/l
1:1	0.312	0.279
1:2	0.161	0.143
1:4	0.081	0.071
1:6	0.053	0.047
1:8	0.041	0.034
1:12	0.027	0.024
1:16	0.020	0.016
1:32	0.011	0.008

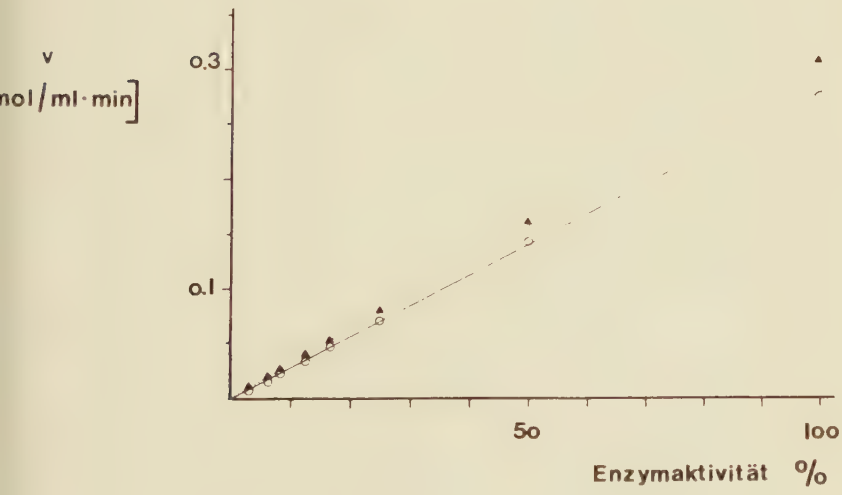


Abb. 7: Substratumsatz als Funktion der Enzymaktivität (F X_a)

▲ Substratkonzentration S 2222 = 2 mmol/l
o Substratkonzentration S 2222 = 1 mmol/l

4.3 Ermittlung der kinetischen Konstanten K_M und v_{max}

Methoden siehe 3.5 und 3.13.1. Zunächst wurde der unter 3.2.2 beschriebene kalziumhaltige Puffer 2 verwendet. Tabelle 2 zeigt die Versuchsergebnisse (arithmetische Mittelwerte aus Doppelbestimmungen).

Die aus diesen Daten nach 3.13.1 ermittelten v_{max} und K_M sind in Tabelle 3 dargestellt.

Zwar sind die Meßdaten innerhalb der einzelnen Meßreihen (Tabelle 2) in hohem Maße korreliert ($r > 0.99$), jedoch streuen die ermittelten Werte für K_M in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Um zu prüfen, ob die Reaktion durch Kalziumionen beeinflußbar ist, wurde im nächsten Versuch die K_M sowohl unter Verwendung von kalziumfreiem Puffer 1 (s. 3.2.1) als auch kalziumhaltigem Puffer 2 (s. 3.3.2) bestimmt.

Tabelle 4 und Abbildung 8 zeigen die Ergebnisse.

In Tabelle 4a sind die aus diesen Daten ermittelten v_{max} und K_M gegenübergestellt.

Tabelle 2: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Substratkonzentration bei konstanten Enzymaktivitäten (Ca^{++}-haltiger Puffer)

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
Enzymkonzentration 0.97 nkat/Test			
2	0.161	0.5	6.18
1	0.100	1	9.89
0.5	0.057	2	17.42
0.25	0.029	4	34.32
0.125	0.015	8	64.43
Enzymkonzentration 0.32 nkat/Test			
2	0.066	0.5	14.89
1	0.042	1	23.40
0.5	0.025	2	39.63
0.25	0.014	4	66.90
0.125	0.006	8	147.26
Enzymkonzentration 0.19 nkat/Test			
2	0.038	0.5	26.13
1	0.021	1	45.87
0.5	0.012	2	79.27
0.25	0.006	4	147.26
0.125	0.003	8	271.28

Tabelle 3: K_M und v_{max} als Funktion der Enzymaktivität (Daten aus Tabelle 2)

Enzymaktivität [nkat/Test]	K_M [mmol/l]	v_{max} [µmol/ml x min]
0.97	3.49	0.44
0.32	4.13	0.23
0.19	2.47	0.07

Tabelle 4: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Substratkonzentration bei verschiedenen Puffern. Enzymkonzentration: 0.71 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
Kalziumfreier Puffer 1			
2	0.075	0.5	13.21
1	0.060	1	16.36
0.5	0.046	2	21.47
0.25	0.027	4	35.54
0.125	0.017	8	57.27
Kalziumhaltiger Puffer 2			
2	0.091	0.5	10.96
1	0.069	1	14.31
0.5	0.040	2	24.54
0.25	0.021	4	46.86
0.125	0.009	8	93.72

Tabelle 4a: K_M und v_{max} bei Verwendung von kalziumfreiem und kalziumhaltigem Puffer. Daten aus Tabelle 4

Puffer	K_M [mmol/l]	v_{max} [µmol/ml•min]
Kalziumfreier Puffer 1	0,56	0,09
Kalziumhaltiger Puffer 2	3,26	0,29

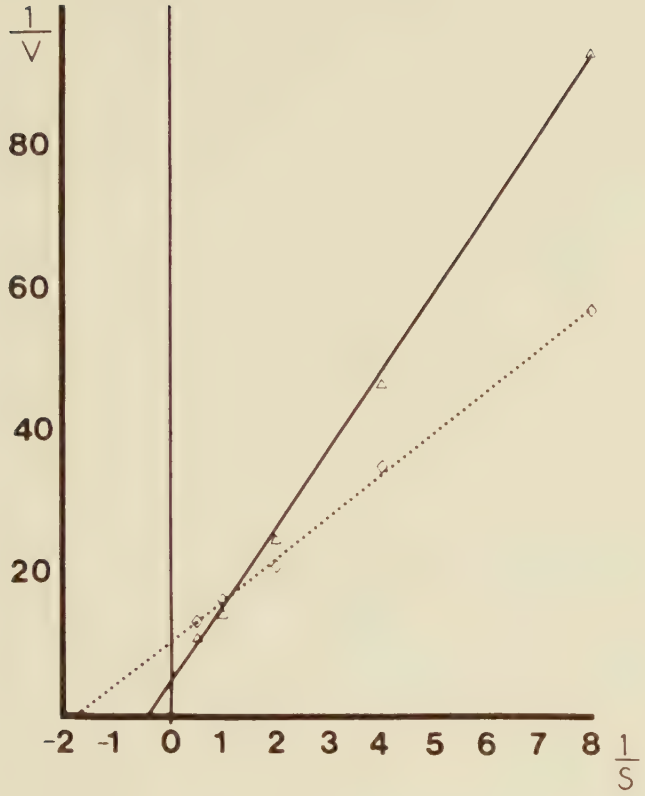


Abb. 8: Substratumsatz als Funktion der Substratkonzentration in der doppelt reziproken Darstellung nach LINEWEAVER-BURK. Daten aus Tabelle 4. Rauten: Kalziumfreier Puffer 1. Dreiecke: Kalziumhaltiger Puffer 2

Im nächsten Versuch wurde die K_M im kalziumfreien Milieu bei verschiedenen F X_a-Aktivitäten bestimmt. Faktor X_a wurde wie in 3.1 beschrieben dialysiert. Nach Dialyse ergab sich ein Kalziumgehalt von 0.03 mmol/l. Tabelle 5 und Abbildung 9 zeigen die Versuchsergebnisse. In Tabelle 5a sind die bei den unterschiedlichen Enzymkonzentrationen gefundenen K_M und v_{max} gegenübergestellt.

Tabelle 5: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Substratkonzentration bei konstanten Enzymkonzentrationen im kalziumarmen Milieu

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
Enzymkonzentration 0.71 nkat/Test			
2	0.111	0.5	8.96
1	0.098	1	10.10
0.5	0.074	2	13.38
0.25	0.052	4	19.09
Enzymkonzentration 0.35 nkat/Test			
2	0.039	0.5	25.51
1	0.033	1	29.45
0.5	0.025	2	39.05
0.25	0.017	4	56.02
Enzymkonzentration 0.23 nkat/Test			
2	0.028	0.5	35.06
1	0.024	1	44.23
0.5	0.017	2	57.27
0.25	0.012	4	83.13

Tabelle 5a: K_M und v_{max} als Funktion der Enzymaktivität im kalziumarmen Milieu (Daten aus Tabelle 5)

Enzymaktivität [nkat/Test]	K_M [mmol/l]	v_{max} [µmol/ml•min]
0,71	0,397	0,135
0,35	0,416	0,047
0,23	0,454	0,033

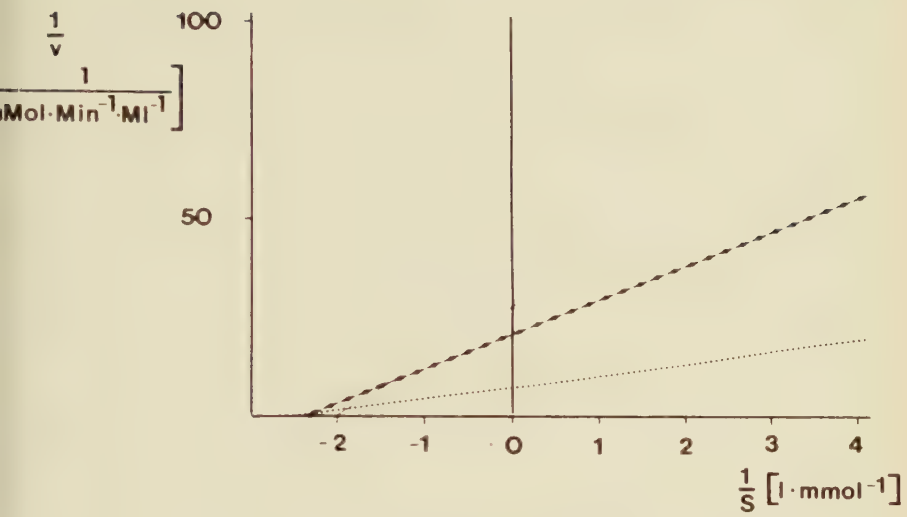


Abb. 9: Daten der Tabelle 5 in der doppelt reziproken Darstellung nach LINEWEAVER-BURK. Punkt. Linie: Enzymkonz. 0.71 nkat/Test; rautierte Linie: Enzymkonz. 0.35 nkat/Test; durchgezogene Linie: Enzymkonz. 0.23 nkat/Test

Aus den Daten der Tabelle 5a ergibt sich eine mittlere K_M von 0.422 mmol/l bei einer Standardabweichung von 0.029 mmol/l (VK = 6,87 %).

Die Schwankungen der K_M in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration sind im Vergleich zu den Daten aus Tabelle 3 deutlich vermindert. Da sich beide Versuchsansätze lediglich durch den Gehalt an Ca^{++}-Ionen unterscheiden, wurde im folgenden die Wirkung von Kalziumionen auf F X_a untersucht.

Zunächst wurde der Kalziumeinfluß auf die Faktor X_a-Aktivität quantifiziert. Das Testsystem entspricht dem in 3.5 beschriebenen, jedoch wurden mit dem Puffer definierte Kalziumkonzentrationen in den Test eingebracht. Die nach 3.13.1 bestimmten Maximalgeschwindigkeiten (v_{max}) wurden in nkat umgerechnet und in Abb. 10 gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen. Tabelle 6 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 6: Enzymaktivität [nkat] als Funktion der Kalziumionenkonzentration

Enyzmverdünnung	Ca^{++} [mmol/l Test]				
	0	2.5	5	10	20
1 : 1	6.6	7.9	11.3	10.8	10.4
1 : 2	3.5	5.2	8.7	6.6	6.1
1 : 3	1.8	4.7	6.9	4.9	3.8
1 : 4	1.4	2.5	3.3	2.7	2.3

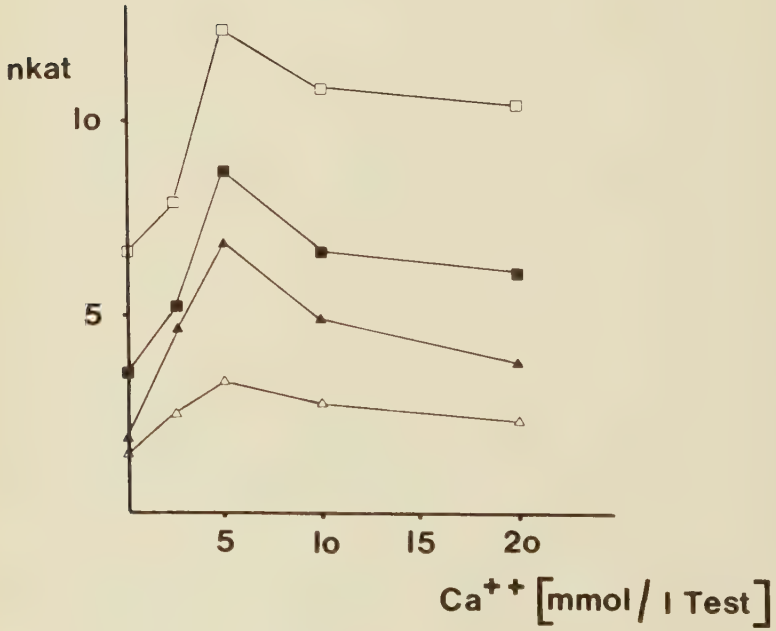


Abb. 10: Einfluß von Kalziumionen auf die Aktivität von Faktor X_a

□ = Enzymverdünnung 1:1
■ = Enzymverdünnung 1:2
▲ = Enzymverdünnung 1:3
△ = Enzymverdünnung 1:4

4.4 Zeitabhängige Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III

Methode siehe 3.6. Zunächst wurde der kalziumhaltige Puffer 2 (siehe 3.2.2) verwendet. Die Enzymkonzentration betrug 1.42 nkat/Test. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse eines über 285 min durchgeführten Versuches. Faktor X_a zeigt einen starken Aktivitätsverlust über die Zeit. Eine befriedigende Endhemmung wird nicht erreicht. Es wurde daher ein zweiter Versuch mit kalziumhaltigem Puffer mit einer Laufzeit von mehr als 20 h durchgeführt (Tabelle 8, Abbildung 11).

Tabelle 7: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Inkubationszeit t_i und der Inhibitorkonzentration (kalziumhaltiges Milieu)

Substratkonzentration: S 2222 2 mmol/l
Faktor X_a: 1,42 nkat/Test

t_i	Antithrombin III-Konzentration [U/Test]		
[min]	0	2.5×10^{-3}	5×10^{-3}
1.5	0.337	0.325	0.337
5	0.343	0.308	n.d.
10	0.325	0.285	0.279
15	0.308	0.267	0.250
20	0.308	n.d.	n.d.
30	0.302	0.263	0.215
60	0.325	0.226	0.162
80	0.291	0.209	0.133
110	0.296	0.180	0.108
120	0.291	0.176	0.102
150	0.302	0.166	0.083
180	0.296	0.155	0.069
210	0.325	0.143	0.067
240	0.273	0.135	0.050
270	n.d.	0.116	0.040
285	0.254	0.124	0.038

Tabelle 8: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Inkubationszeit t_i und der Inhibitorkonzentration (kalziumhaltiges Milieu)

Substratkonzentration: S 2222 2 mmol/l
Enzymkonzentration: F X_a 1,42 nkat/Test

t_i	Antithrombin III-Konzentration [U/Test]		
[min]	0	2.5×10^{-3}	5×10^{-3}
2	0.318	0.333	0.337
5	0.337	0.325	0.318
10	0.341	0.314	0.287
15	0.325	0.298	0.271
20	0.341	n.d.	n.d.
25	0.341	n.d.	0.248
30	0.341	0.263	0.232
59	0.333	0.228	0.178
75	0.310	0.213	0.147
200	0.325	0.162	0.075
290	0.294	0.139	0.050
345	0.275	0.120	0.031
1250	0.213	0.073	0.007
1465	0.205	0.060	0.003

Um die Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III im kalziumarmen Milieu studieren zu können, wurden Hemmversuche unter Verwendung von Puffer 1 (siehe 3.2.1) durchgeführt. Zusätzlich wurde AT III wie unter 3.1 beschrieben dialysiert. Danach betrug die Kalziumkonzentration 0.29 mmol/l.

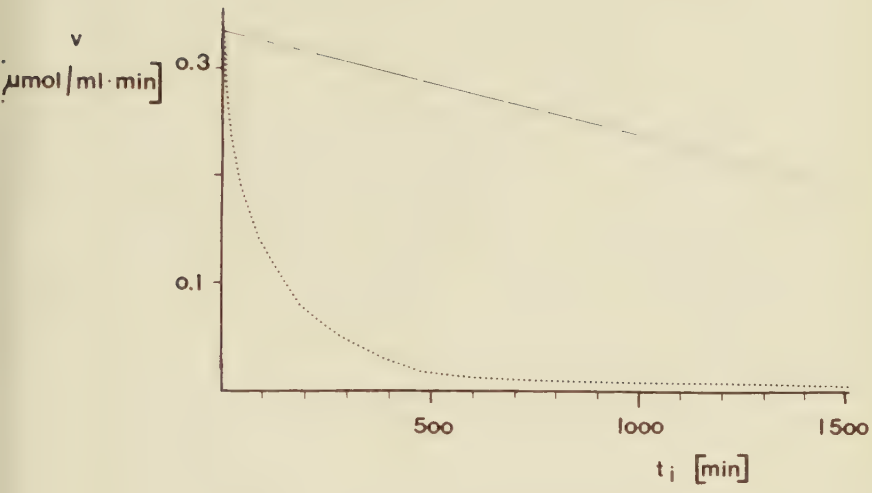


Abb. 11: Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III als Funktion der Zeit. Daten aus Tabelle 8

——— AT III = 0 U/Test
..... AT III = $2{,}5 \times 10^{-3}$ U/Test
••••• AT III = 5×10^{-3} U/Test

In Tabelle 9 ist der Verlauf der Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III im kalziumarmen Milieu dargestellt.

Ein zweiter Versuch, der mit vier Antithrombin III-Konzentrationen durchgeführt wurde (Tabelle 10, Abb. 12), ermöglicht die Berechnung der Wechselzahl von Faktor X_a mit dem Kunstsubstrat S 2222.

Voraussetzung für diese Berechnung ist, daß Antithrombin III mit F X_a einen stabilen äquimolaren Komplex (8) eingeht. Nach erfolgter Hemmung kann daher von der Menge an eingesetztem Antithrombin III und der Umsatzdifferenz von S 2222 vor und nach Abschluß der Hemmung auf die hierfür erforderliche Enzymmenge rückgeschlossen werden.

Tabelle 9: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Inkubationszeit t_i und der Inhibitorkonzentration (kalziumarmes Milieu)

Substratkonzentration: S 2222 2 mmol/l
Enzymkonzentration: F X_a 1,42 nkat/Test

t_i [min]	Antithrombin III-Konzentration [U/Test]		
	0	5×10^{-3}	1×10^{-2}
2.2	0.294	0.283	0.294
5.5	0.302	0.287	0.263
10.2	0.298	0.294	0.252
15.2	0.302	0.263	0.232
20.2	0.306	0.263	0.217
25.2	0.302	0.252	0.197
30	0.306	0.240	0.186
60	0.306	0.205	0.124
90	0.291	0.174	0.085
120	0.298	0.155	0.062
150	0.298	0.135	0.048
162	0.294	0.126	0.040
180	0.287	0.120	0.036
210	0.302	0.108	0.025
220	0.302	0.106	0.023
240	0.291	0.097	0.019
270	0.294	0.097	0.015

Diese Berechnung hat jedoch überschlägigen Charakter, da keine stabile Endhemmung erreicht wird, wie aus Abb. 12 und insbesondere aus Abb. 28 deutlich hervorgeht. Da die Inhibition von F X_a durch AT III in der Endphase (s. Abb. 12) extrem langsam verläuft, erscheint die im folgenden dargestellte Berechnung gerechtfertigt.

Tabelle 10: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Inkubationszeit t_i und der Inhibitorkonzentration (kalziumarmes Milieu)

Substratkonzentration: S 2222 2 mmol/l
Enzymkonzentration: F X_a 1,42 nkat/Test

t_i	Antithrombin III-Konzentration [U/Test]			
[min]	0	2.5×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}
3	0.314			
10		0.294	0.287	0.256
13	0.318			
15		0.294	0.279	0.240
20		0.287	0.263	0.225
25	0.318			
30		0.283	0.248	0.186
45	0.318			
60		0.256	0.201	0.124
70	0.318			
90		0.240	0.166	0.081
110	0.325			
120		0.232	0.147	0.058
150	0.318			
180		0.209	0.108	0.031
220	0.302			
225		0.197	0.089	0.019
240	0.302			
260		0.190	0.081	0.015
270	0.310			
290		0.178	0.071	0.011
297		0.186	0.071	

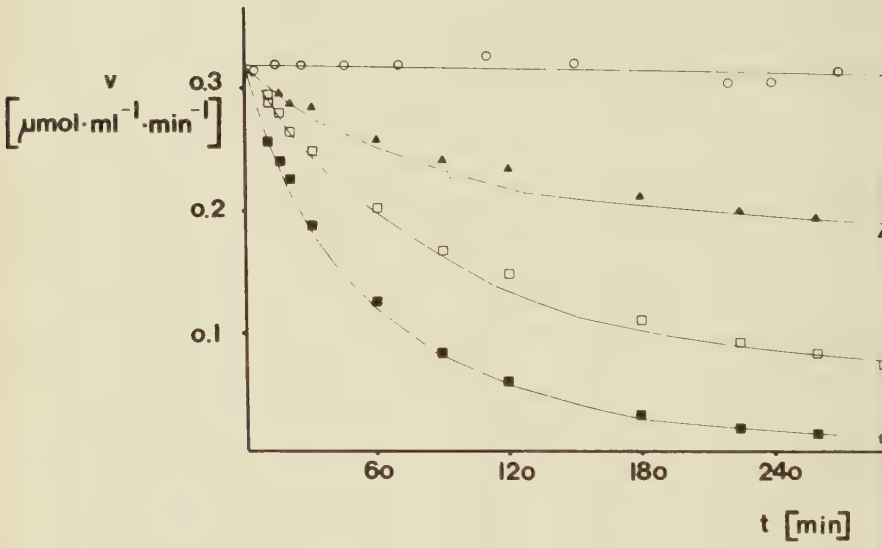


Abb. 12: Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III (Daten aus Tabelle 10) als Funktion der Zeit

Punkte: Antithrombin III-Konzentration 0 U/Test
Dreiecke: Antithrombin III-Konzentration 2.5×10^{-3} U/Test
Vierecke (offen): Antithrombin III-Konzentration 5×10^{-3} U/Test
Vierecke (ausgefüllt): Antithrombin III-Konzentration 1×10^{-2} U/Test

Durch immunologische Proteinbestimmung wurde ermittelt, daß einer Einheit Antithrombin III 0.47 mg AT III-Protein entsprechen. Unter Zugrundelegung einer Molmasse von 64.000 Daltons für AT III (13) folgt daraus, daß 1 U 7.34×10^{-9} Mol AT III zuzuordnen ist.

- Berechnung für eine AT III-Konzentration von 5×10^{-3} U/Test. 5×10^{-3} U AT III/Test entsprechen $3,67 \times 10^{-11}$ mol. Die gemessene Umsatzdifferenz zum Leerwert beträg nachdem die Hemmung in eine extrem langsame Phase ein treten ist, 2.43×10^{-7} mol/min x ml bzw. $1,45 \times 10^{-7}$ min x Test. Daraus folgt für die Wechselzahl (WZ) von F X_a mit dem Kunstsubstrat S 2222.

$$WZ = \frac{1{,}45 \times 10^{-7}}{3{,}64 \times 10^{-11}} = 3{,}95 \times 10^{3}/\text{min}$$

- Berechnung für eine AT III-Konzentration von 2,5 x 10^{-3} U/Test. Im Test enthalten sind 1,83 x 10^{-11} mol AT III. Die Umsatzdifferenz beträgt 7,67 x 10^{-8} mol/min x Test. Für die Wechselzahl gilt daher:

$$WZ = \frac{7{,}67 \times 10^{-8}}{1{,}83 \times 10^{-11}} = 4{,}19 \times 10^{3}/\text{min}$$

4.5 Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex als Funktion der Zeit

Methode siehe 3.7. Für die Hemmversuche mit dem Antithrombin III-Heparin-Komplex wurde ausschließlich kalziumfreier Puffer 1 (siehe 3.2.1) verwendet. AT III und F X_a wurden wie in 3.1 beschrieben dialysiert. Wegen eines Kalziumgehaltes von 0.2 mmol/l erübrigte sich eine Weiterbehandlung der verwendeten Heparinpräparation (siehe 2.10.).

Zunächst betrug das Verhältnis der Einheiten AT III zu Heparin 1 : 28.5. Dabei ergab sich in der Anfangsphase der Hemmung eine signifikante Beschleunigung gegenüber dem nicht heparinaktivierten AT III, jedoch fiel das Substrat in der Endphase der Inhibition aus (Tabelle 11).

Daher wurde im nächsten Versuch unter sonst unveränderten Bedingungen das Verhältnis AT III : Hep. auf 1 : 6,2 reduziert (Tabelle 12). Bei dieser Heparinkonzentration war keine Ausfällung zu beobachten.

Tabelle 11: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Inkubationszeit t_i und der Inhibitor- und Heparinkonzentration

Substratkonzentration: S 2222 2 mmol/l
Enzymkonzentration: F X_a 1,42 nkat/Test

t_i	Antithrombin III-/Heparinkonzentration [U/Test]		
[min]	0/0	1×10^{-2}/0	1×10^{-2}/2.8 x 10^{-1}
2	0.372	0.349	0.310
10	0.364	0.318	0.256
20		0.271	0.201
40		0.209	0.139
65		0.178	0.100
105		0.124	0.061
175	0.364	0.062	Substr. fällt aus
219		0.054	Substr. fällt aus

Tabelle 12: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Inkubationszeit t_i und der Inhibitor- bzw. der Heparinkonzentration

Substratkonzentration: S 2222 2 mmol/l
Enzymkonzentration: F X_a 1,42 nkat/Test

t_i	Antithrombin III-/Heparinkonzentration [U/Test]		
[min]	0/0	1×10^{-2}/0	1×10^{-2}/6.2 x 10^{-2}
2	0.341	0.325	0.310
5		0.318	0.294
10	0.341	0.302	0.263
25	0.349	0.240	0.209
60	0.341	0.166	0.131
90	0.116	0.116	0.085
120		0.080	0.068
150		0.062	0.046
210		0.040	0.023
230		0.036	0.023

Da die Hemmung der Faktor X_a-Aktivität bei diesem Versuch nahezu 100 %ig war, wurde die Antithrombin III-Konzentration auf 5 x 10^{-3} U/Test reduziert. Zudem wurde die Inkubationszeit t_i wesentlich verlängert.

Tabelle 13: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Inkubationszeit t_i und der Inhibitor- bzw. Heparinkonzentration

Substratkonzentration: S 2222 2 mmol/l
Enzymkonzentration: F X_a 1,42 nkat/Test

t_i	Antithrombin III-/Heparinkonzentration [U/Test]		
[min]	0/0	5 x 10^{-3}/0	5 x 10^{-3}/3.3 x 10^{-2}
2	0.325	0.333	0.318
10		0.341	0.287
35	0.349	0.271	0.248
65		0.232	0.205
90	0.333	0.205	0.174
125		0.176	0.153
165	0.333	0.145	0.124
240		0.112	0.089
300	0.372	0.089	0.071
330	0.333	0.083	0.065
1340	0.349	0.011	0.009
1400	0.341	0.011	0.009

Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Abb. 13 dargestellt.

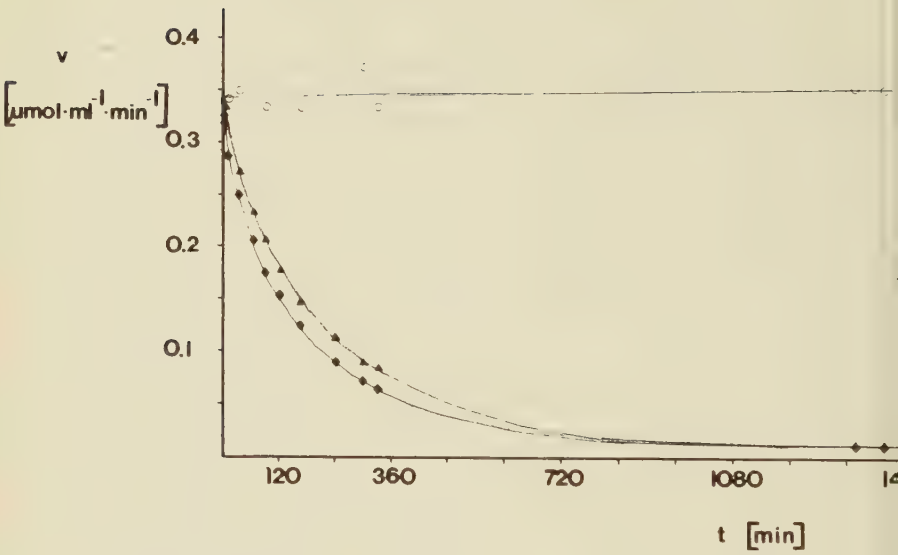


Abb. 13: Hemmung von F X durch AT III bzw. den AT III-Heparin-Komplex

Punkte: AT III- und Heparinkonzentration 0 U/Test;
Dreiecke: AT III;
Rauten: AT III-/Heparin-Komplex.

Daten aus Tabelle 13

Im nächsten Versuch wurde - entsprechend dem in 3.9 beschriebenen Versuchsansatz - die beschleunigende Wirkung von Heparin auf die Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III durch eine kontinuierliche Registrierung der pNA-Freisetzung bei minimaler Schreibergeschwindigkeit [5 mm/min] nachgewiesen. Abb. 14 zeigt in einer halbschematischen Darstellung das Ergebnis.

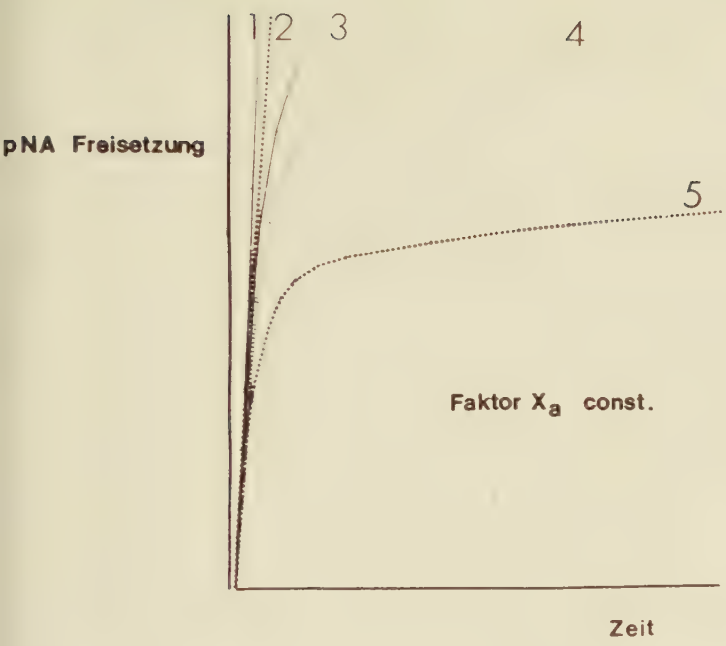


Abb. 14: Kontinuierliche Registrierung der pNA-Freisetzung bei Spaltung von S 2222 durch F X_a

1	S 2222	F X_a			
2	S 2222	F X_a	AT III [1 U/Test]		
3	S 2222	F X_a	AT III [1 U/Test]	Heparin	[1.25 U/Test]
4	S 2222	F X_a	AT III [1 U/Test]	Heparin	[2.50 U/Test]
5	S 2222	F X_a	AT III [1 U/Test]	Heparin	[5.00 U/Test]

Substratkonzentration S 2222 = 2 mmol/l
Enzymkonzentration F X_a = 1,42 nkat/Test

4.6 Zeitabhängigkeit der AT III-Heparin-Wechselwirkung

Prinzip siehe 3.10. Das Verhältnis der Einheiten AT III zu Heparin betrug 1 : 5. Tabelle 14 zeigt das Versuchsergebnis. Daraus folgt, daß keine zeitliche Abhängigkeit der F X_a-Restaktivität von der Präinkubationsdauer von AT III mit Heparin besteht.

Tabelle 14: Faktor X_a-Restaktivität bei Hemmung durch AT III in Abhängigkeit der Inkubationszeit t_i zwischen AT III und Heparin. Die Messung der F^iX_a-Restaktivität erfolgte sofort nach Mischung von AT III-Hep. und F X_a

S = 1 mmol/l; AT III = 1 U/Test; Heparin = 5 U/Test

t_i [min]	Reaktionsgeschwindigk. v [µmol/ml x min]
1	0.145
2	0.147
3	0.147
10	0.149

4.7 Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III in Gegenwart von S 2222

Methode siehe 3.8. Als Puffer wurde der unter 3.2.1 beschriebene kalziumfreie Puffer 1 verwendet. AT III und Faktor X_a wurden dialysiert (siehe 3.2.1). Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 15 und Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 15: Substratumsatz als Funktion der Substrat- und der Inhibitorkonzentration

F X_a-Konzentration: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
Antithrombin III-Konzentration 0 U/ml			
1	0.304	1	3.28
0.5	0.256	2	3.90
0.25	0.201	4	4.95
0.125	0.124	8	8.05
Antithrombin III-Konzentration 2.5 U/ml			
1	0.292	1	3.42
0.5	0.248	2	4.02
0.25	0.194	4	5.15
0.125	0.116	8	8.62

Fortsetzung Tabelle 15

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
Antithrombin III-Konzentration 5 U/ml			
1	0.289	1	3.45
0.5	0.248	2	4.02
0.25	0.162	4	6.15
0.125	0.102	8	9.72
Antithrombin III-Konzentration 10 U/ml			
1	0.279	1	3.57
0.5	0.240	2	4.15
0.25	0.157	4	6.36
0.125	0.095	8	10.51

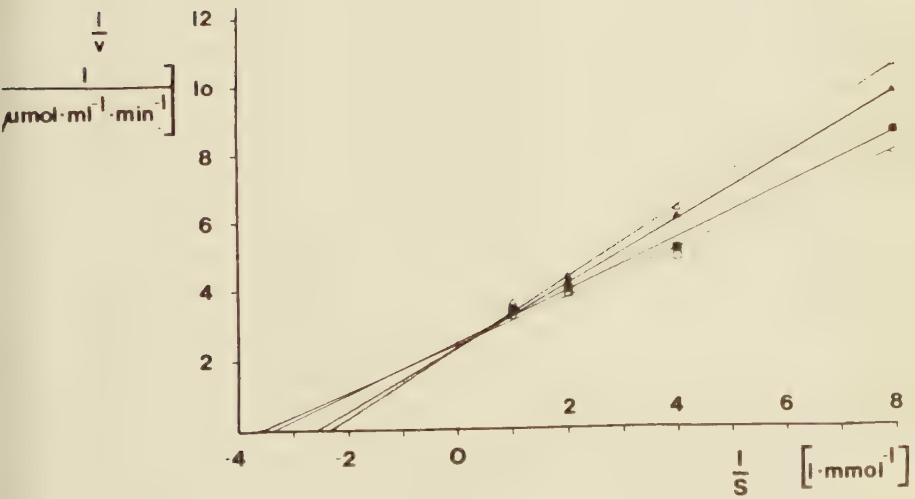


Abb. 15: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in doppelt reziproker Auftragung (Erklärung der Symbole siehe Seite 42)

nach LINEWEAVER-BURK bei verschiedenen Antithrombin III-Konzentrationen

- □ Antithrombin III-Konzentration 0 U/ml
- ■ Antithrombin III-Konzentration 2.5 U/ml
- ▲ Antithrombin III-Konzentration 5.0 U/ml
- △ Antithrombin III-Konzentration 10 U/ml

Abbildung 16 zeigt die Abhängigkeit der MICHAELIS-Konstanten von der Antithrombin III-Konzentration.

Die Daten dieses Versuchs ermöglichen die Ermittlung der K_i nach dem in 3.13.2 beschriebenen Verfahren. Die Substratumsätze bei definierten Substrat- und Inhibitorkonzentrationen wurden aus Abb. 15 entnommen. Die so ermittelten und umgestellten Daten sind in Tabelle 16 dargestellt.

Aus der DIXON-Darstellung (Abb. 17) ergibt sich eine K_i von 19.64 U AT III/ml in heparinfreiem Milieu. Dies entspricht 1.44×10^{-7} mol AT III/ml.

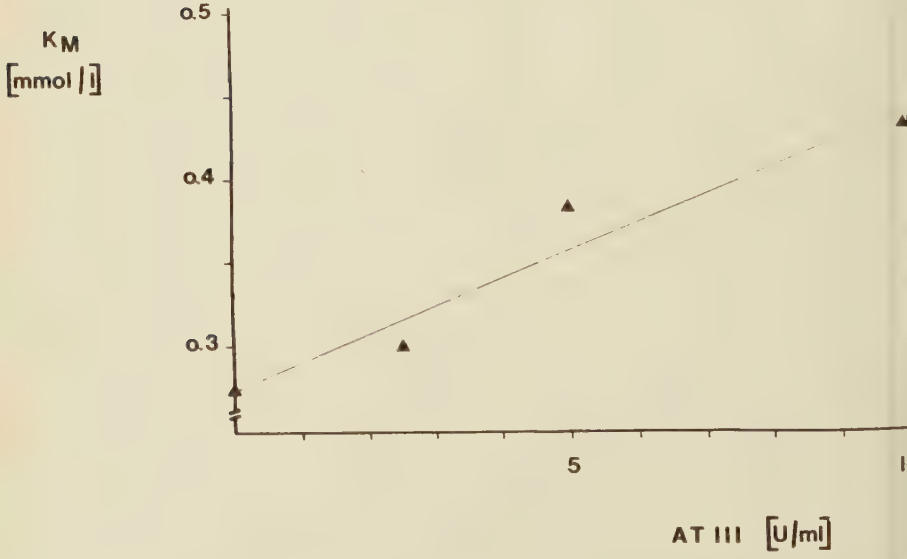


Abb. 16: K_M als Funktion der AT III-Konzentration. Berechnung aus den Daten der Tabelle 15

Tabelle 16: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Substrat- und Inhibitorkonzentration

AT III-Konz. [U/ml]	Substratkonzentration S [mmol/l]			
	1	0.5	0.25	0.125
0	3.16	3.85	5.21	7.94
2.5	3.24	3.99	5.48	8.47
5	3.31	4.22	6.05	9.72
10	3.35	4.37	6.40	10.46

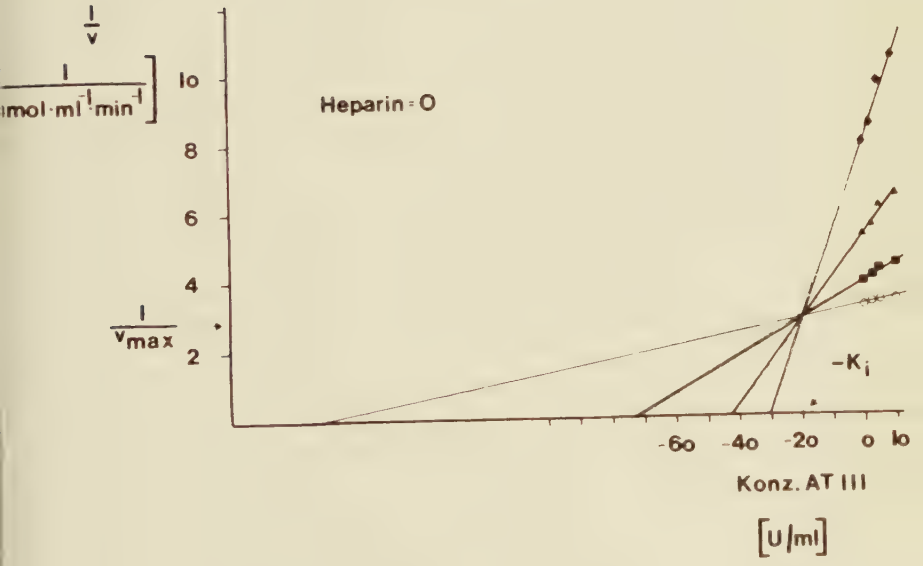


Abb. 17: Darstellung der Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III nach DIXON bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen

Rauten: S 2222 0.125 mmol/l
Dreiecke: S 2222 0.250 mmol/l
Vierecke: S 2222 0.500 mmol/l
Kreise: S 2222 1.000 mmol/l

4.8 Hemmung von Faktor X_a durch den Antithrombin III-Heparin-Komplex in Gegenwart von S 2222

Prinzip siehe 3.9 und 3.13.1. Zunächst betrug das Verhältnis der Einheiten AT III zu Heparin 1 : 2. Als Leerwert wurde statt AT III aq. dest. im Test eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde zwar die Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III beschleunigt, jedoch fiel S 2222 im Leerwert aus (Abb. 18). F X_a kommt als Ursache der Ausfällungsreaktion nicht in Betracht, da sogar höhere Heparinkonzentrationen in Versuch 4.9 keine Fällung bewirken.

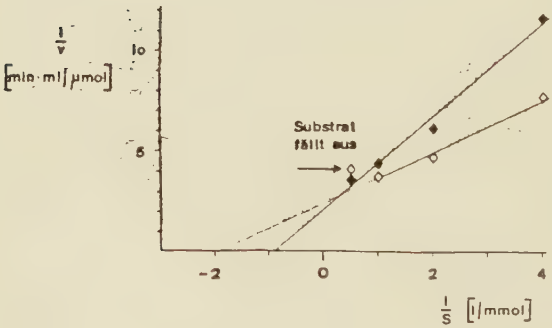


Abb. 18: Substratumsatz als Funktion der Substratkonzentration in der doppelt reziproken Darstellung nach LINEWEAVER-BURK

◇ AT III: 0 U/ml Heparin 20 U/ml
◆ AT III: 10 U/ml Heparin 20 U/ml

Auf einen freies Heparin enthaltenden Leerwert mußte daher verzichtet werden. Um einen neuen Leerwert zu erhalten, wurde Heparin durch aq. dest. ersetzt.

Zuerst wurde der Einfluß einer wechselnden Heparinkonzentration auf die Hemmung von Faktor X_a durch eine konstante Antithrombin III-Menge von 10 U/ml untersucht (Tab. 17, 18, ,19, 20).

Tabelle 17: Substratumsatz als Funktion der Substrat-, AT III- und Heparinkonzentration
F X_a: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml·min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min·ml/µmol]
AT III 0 U/ml; Heparin 0 U/ml			
2	0.356	0.5	2.80
1	0.318	1	3.14
0.5	0.259	2	3.84
0.25	0.182	4	5.84
K_M = 0.38 mmol/l; v_{max} = 0.44 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 50 U/ml			
2	0.337	0.5	2.96
1	0.232	1	4.29
0.5	0.141	2	7.06
0.25	0.087	4	11.45
K_M = 1.27 mmol/l; v_{max} = 0.525 µmol/ml x min			

Tabelle 18: Substratumsatz als Funktion der Substrat-, AT III- und Heparinkonzentration

$F X_a$: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
AT III 0 U/ml; Heparin 0 U/ml			
2	0.380	0.5	2.63
1	0.322	1	3.10
0.5	0.256	2	3.90
0.25	0.194	4	5.15
K_M = 0.30 mmol/l; v_{max} = 0.423 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 16 U/ml			
2	0.325	0.5	3.06
1	0.302	1	3.30
0.5	0.240	2	4.15
0.25	0.139	4	7.15
K_M = 0.535 mmol/l; v_{max} = 0.46 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 33 U/ml			
2	0.325	0.5	3.06
1	0.294	1	3.39
0.5	0.194	2	5.15
0.25	0.108	4	9.20
K_M = 1.0 mmol/l; v_{max} = 0.554 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 50 U/ml			
2	0.333	0.5	2.99
1	0.279	1	3.57
0.5	0.186	2	5.36
0.25	0.093	4	10.73
K_M = 1.58 mmol/l; v_{max} = 0.700 µmol/ml x min			

Tabelle 19: Substratumsatz als Funktion der Substrat-, AT III- und Heparinkonzentration

F X_a-Konzentration: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml·min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min·ml/µmol]
AT III 0 U/ml; Heparin 0 U/ml			
1	0.294	1	3.39
0.5	0.263	2	3.79
0.25	0.192	4	5.15
0.125	0.116	8	8.59
K_M = 0.319 mmol/l; v_{max} = 0.420 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 62.5 U/ml			
1	0.258	1	3.87
0.5	0.137	2	7.25
0.25	0.081	4	12.27
0.125	0.046	8	21.47
K_M = 1.40 mmol/l; v_{max} = 0.56 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 71.4 U/ml			
1	0.240	1	4.15
0.5	0.128	2	7.81
0.25	0.077	4	12.88
0.125	0.042	8	23.43
K_M = 1.40 mmol/l; v_{max} = 0.51 µmol/ml x min			

Tabelle 20: Substratumsatz als Funktion der Substrat-, AT III- und Heparinkonzentration

F X_a-Konzentration: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
AT III 0/U ml; Heparin 0 U/ml			
1	0.314	1	3.18
0.5	0.263	2	3.79
0.25	0.192	4	5.20
0.125	0.118	8	8.45
K_M= 0.330 mmol/l; v_{max} = 0.43 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 0 U/ml			
1	0.314	1	3.18
0.5	0.244	2	4.08
0.25	0.170	4	5.85
0.125	0.100	8	9.91
K_M = 0.450 mmol/l; v_{max} = 0.46 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 6.2 U/ml			
1	0.314	1	3.18
0.5	0.246	2	4.05
0.25	0.157	4	6.36
0.125	0.083	8	11.99
K_M = 0.800 mmol/l; v_{max} = 0.62 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 12.5 U/ml			
1	0.310	1	3.33
0.5	0.232	2	4.29
0.25	0.129	4	7.69
0.125	0.073	8	13.56
K_M = 1.09 mmol/l; v_{max} = 0.64 µmol/ml x min			

Fortsetzung Tabelle 20

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
AT III 10 U/ml; Heparin 25 U/ml			
1	0.304	1	3.28
0.5	0.207	2	4.81
0.25	0.122	4	8.18
0.125	0.065	8	15.16
K_M = 1.17 mmol/l; v_{max} = 0.68 µmol/ml x min			
AT III 10 U/ml; Heparin 50 U/ml			
1	0.271	1	3.68
0.5	0.159	2	6.29
0.25	0.091	4	10.96
0.125	0.050	8	19.82
K_M = 1.44 mmol/l; v_{max} = 0.62 µmol/ml x min			

Wenn das Verhältnis der Einheiten Heparin zu AT III größer als 7.5 : 1 wurde, fiel S 2222 aus.

Abb. 19 zeigt die Daten der Tabelle 20 in der Darstellung nach LINEWEAVER-BURK.

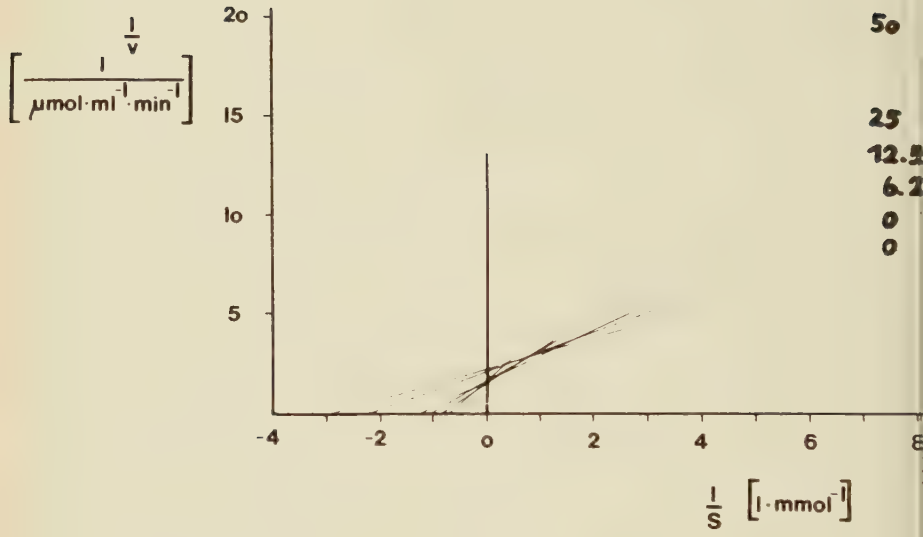


Abb. 19: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in doppelt reziproker Auftragung nach LINEWEAVER-BURK.
Die untere Gerade gibt den Leerwert wieder (Antithrombin III- und Heparinkonzentration 0 U/ml). Ansonsten betrug die AT III-Konzentration konstant 10 U/ml. Heparin wurde in steigender Konzentration (0; 6.2; 12.5; 25; 50 U/ml) eingesetzt.
Auf eine Darstellung der Meßpunkte wurde der Obersichtlichkeit wegen verzichtet. Der Korrelationskoeffizient (r) liegt jedoch bei jeder Geraden über 0.99. Die Zahlen an den einzelnen Geraden bezeichnen die Heparinkonzentration in U/ml.

Die Abhängigkeit der K_M von der Heparinkonzentration bei konstantem AT III-Spiegel ist durch einen e-funktionellen Verlauf gekennzeichnet (Abb. 20 aus Daten der Tabellen 19 und 20).

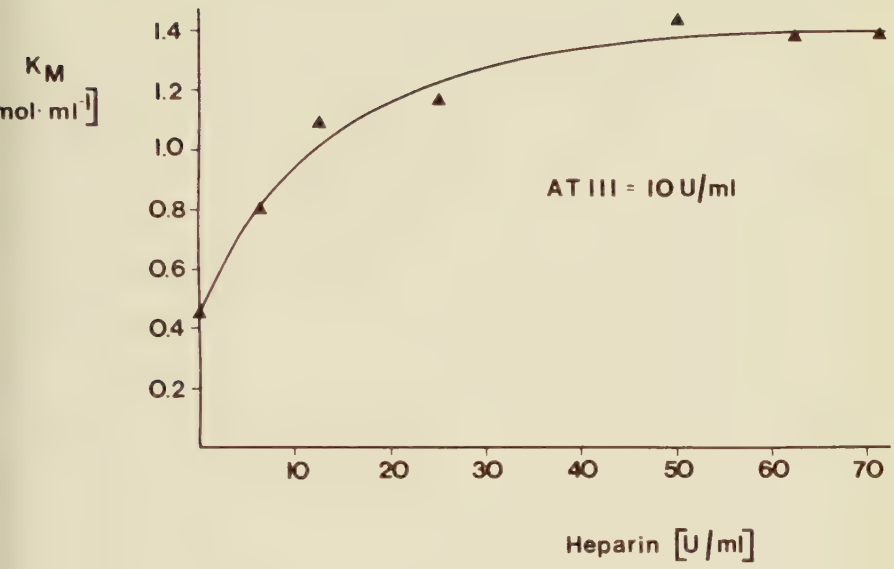


Abb. 20: K_M als Funktion der Heparinkonzentration bei konstantem Antithrombin III-Spiegel

Die AT III-Konzentration wurde auf 5 U/ml reduziert (Tab. 21). Die Abhängigkeit der K_M von der Heparinkonzentration bei dieser Inhibitorkonzentration zeigt Abbildung 21.

Die Hemmung von Faktor X_a durch wechselnde Antithrombin III-Konzentrationen bei jeweils maximaler Aktivierung durch Heparin wurde untersucht. Das Verhältnis der Einheiten Antithrombin III zu Heparin betrug 1 : 5 (Tabelle 22, Abbildung 22).

Abbildung 23 zeigt die Abhängigkeit der K_M von der AT III-Konzentration bei maximaler Heparinaktivierung (Verhältnis AT III zu Heparin konstant 1 : 5).

Tabelle 21: Substratumsatz als Funktion der Substrat-, AT III und Heparinkonzentration

F X_a-Konzentration: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min ml/µmol]
AT III 0 U/ml; Heparin 0 U/ml			
1	0.314	1	3.18
0.5	0.263	2	3.79
0.25	0.197	4	5.05
0.125	0.126	8	7.93
K_M = 0.280 mmol/l; v_{max} = 0.411 µmol/ml x min			
AT III 5 U/ml; Heparin 0 U/ml			
1	0.318	1	3.14
0.5	0.254	2	3.93
0.25	0.168	4	5.92
0.125	0.100	8	9.91
K_M = 0.473 mmol/l; v_{max} = 0.485 µmol/ml x min			
AT III 5 U/ml; Heparin 6.25 U/ml			
1	0.298	1	3.34
0.5	0.252	2	3.96
0.25	0.166	4	5.99
0.125	0.085	8	11.71
K_M = 0.735 mmol/l; v_{max} = 0.602 µmol/ml x min			
AT III 5 U/ml; Heparin 12.5 U/ml			
1	0.302	1	3.30
0.5	0.225	2	4.44
0.25	0.147	4	6.78
0.125	0.081	8	12.27
K_M = 0.826 mmol/l; v_{max} = 0.621 µmol/ml x min			

Fortsetzung Tabelle 21

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
AT III 5 U/ml; Heparin 25 U/ml			
1	0.306	1	3.26
0.5	0.201	2	4.96
0.25	0.116	4	8.59
0.125	0.065	8	15.16
K_M = 1.063 mmol/l; v_{max} = 0.621 µmol/ml x min			
AT III 5 U/ml; Heparin 35.5 U/ml			
1	0.294	1	3.39
0.5	0.178	2	5.60
0.25	0.108	4	9.20
0.125	0.062	8	16.10
K_M = 0.980 mmol/l; v_{max} = 0.543 µmol/ml x min			

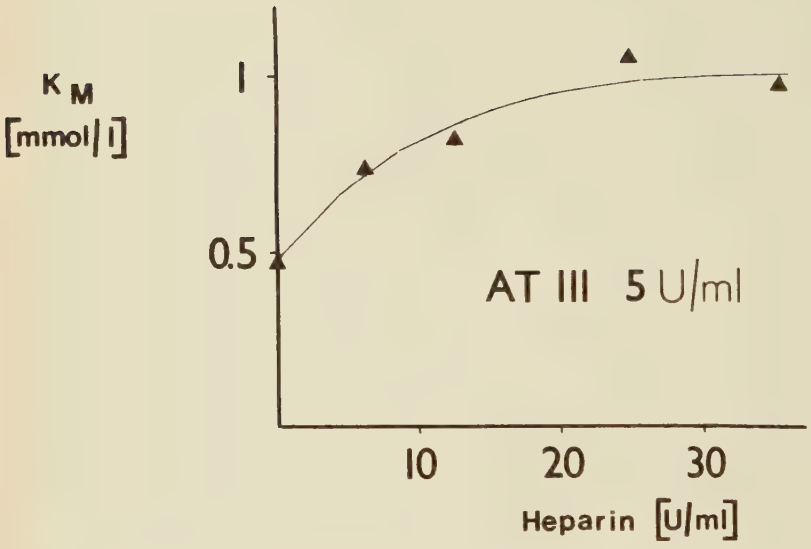


Abb. 21: K_M als Funktion der Heparinkonzentration (Daten aus Tabelle 21)

Tabelle 22: Substratumsatz als Funktion der Substrat- und AT III-Konzentration bei maximaler AT III-Aktivierung durch Heparin (Verhältnis AT III zu Heparin konstant 1 : 5)

F X_a-Konzentration: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml·min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min·ml/µmol]
AT III 0 U/ml			
1	0.310	1	3.22
0.5	0.259	2	3.84
0.25	0.201	4	4.95
0.125	0.108	8	9.20
K_M = 0.41 mmol/l; v_{max} = 0.48 µmol/ml x min			

Fortsetzung Tabelle 22

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml·min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min·ml/ µmol]
AT III 1.25 U/ml			
1	0.318	1	3.14
0.5	0.263	2	3.79
0.25	0.170	4	5.85
0.125	0.093	8	10.73
K_M = 0.64 mmol/l; v_{max} = 0.57 µmol/ml x min			
AT III 2.5 U/ml			
1	0.302	1	3.30
0.5	0.248	2	4.02
0.25	0.147	4	6.78
0.125	0.085	8	11.71
K_M = 0.67 mmol:l; v_{max} = 0.54 µmol/ml x min			
AT III 5 U/ml			
1	0.287	1	3.48
0.5	0.209	2	4.77
0.25	0.116	4	8.59
0.125	0.065	8	15.16
K_M = 1.03 mmol/l; v_{max} = 0.60 µmol/ml x min			
AT III 7.1 U/ml			
1	0.291	1	3.43
0.5	0.182	2	5.48
0.25	0.101	4	9.91
0.125	0.058	8	17.18
K_M = 1.20 mmol/l; v_{max} = 0.61 µmol/ml x min			

Fortsetzung Tabelle 22

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml·min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min·ml/µmol]
AT III 10.0 U/ml			
1	0.259	1	3.84
0.5	0.155	2	6.44
0.25	0.089	4	11.20
0.125	n.d.	8	n.d.
K_M = 1.69 mmol/l; v_{max} = 0.68 µmol/ml x min			

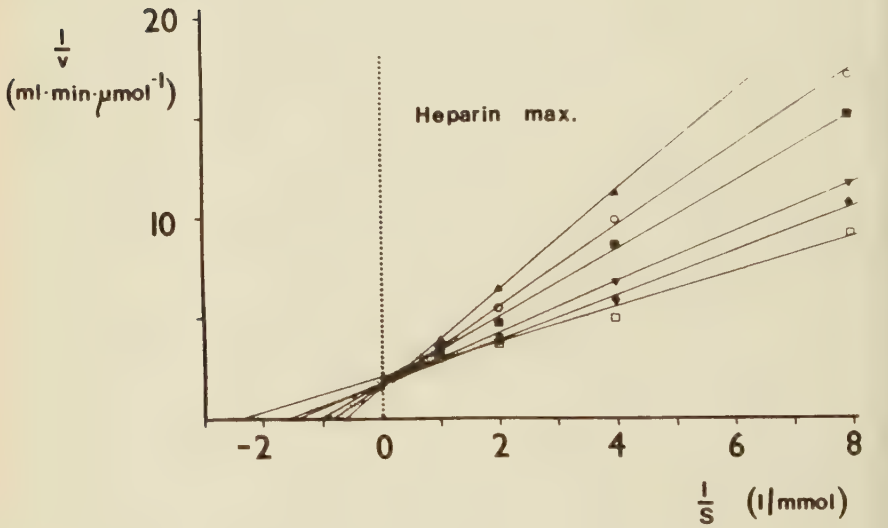


Abb. 22: Substratumsatz als Funktion der Substratkonzentration in der doppelt reziproken Darstellung nach LINEWEAVER-BURK bei verschiedenen AT III-Konzentrationen mit jeweils maximaler Heparinaktivierung (Daten aus Tabelle 22

□ AT III 0 U/ml Hep. 0 U/ml
◆ AT III 1,25 U/ml Hep. 6,25 U/ml
▽ AT III 2,5 U/ml Hep. 12,5 U/ml
■ AT III 5,0 U/ml Hep. 25,0 U/ml
○ AT III 7,10 U/ml Hep. 35,5 U/ml
▲ AT III 10,0 U/ml Hep. 50,0 U/ml

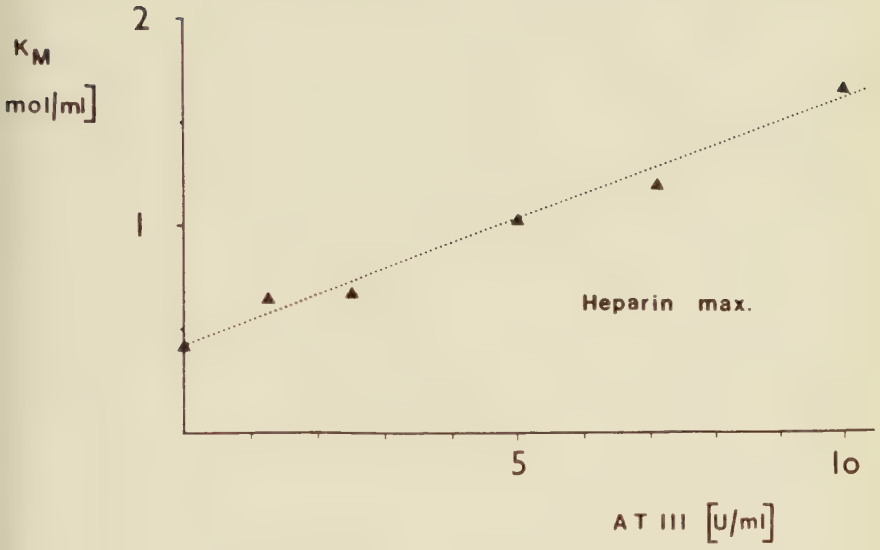


Abb. 23: K_M als Funktion der AT III-Konzentration bei maximaler Heparinaktivierung. Daten aus Tabelle 22

Nach dem unter 3.13.2 beschriebenen Verfahren wurde die K_i für den Antithrombin III-Heparin-Komplex ermittelt. Die Daten wurden der Abbildung 22 entnommen und umgruppiert (Tab. 23). Abbildung 24 zeigt die Darstellung nach DIXON. Die K_i beträgt 5.2 U AT III/ml bzw. 3.81×10^{-8} mol AT III/ml.

Tabelle 23: Substratumsatz [µmol/ml x min] als Funktion der Substrat- und der AT III-Konzentration bei maximaler Aktivierung durch Heparin. Daten aus Abbildung 22

AT III-Konz. [U/ml]	Substratkonzentration [mmol/l]					
	0.5	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1
10	6.70	10.15	12.00	14.60	18.90	27.50
7.1	5.55	8.20	9.50	11.50	14.80	21.30
5	5.05	7.30	8.50	10.25	13.10	18.80
2.5	4.35	6.00	6.85	8.10	10.25	14.40
1.25	3.90	5.35	6.10	7.20	9.10	12.70
0	3.65	4.80	5.40	6.30	7.70	10.50

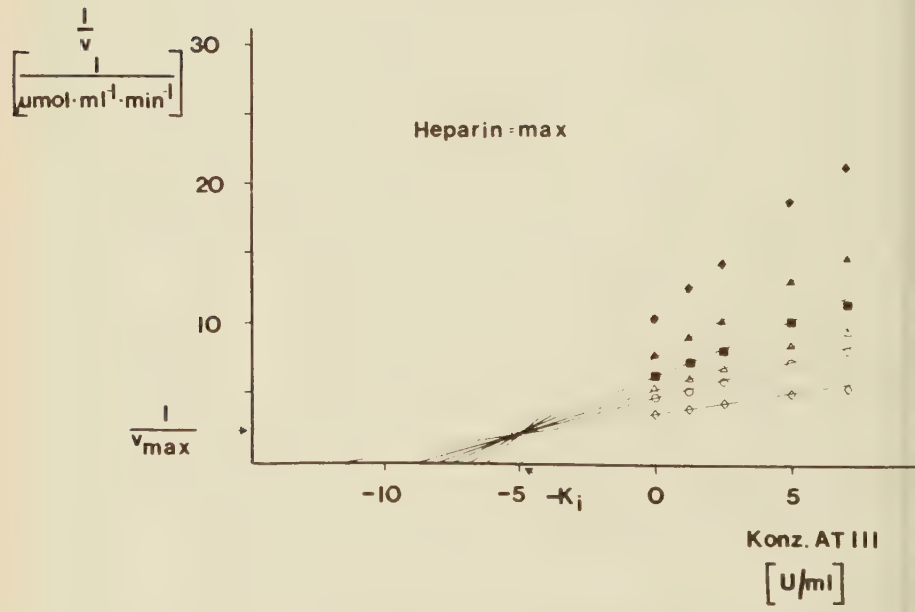


Abb. 24: Daten aus Tabelle 23 in der Darstellung nach DIXON

◆ S 2222 0.1 mmol/l
▲ S 2222 0.15 mmol/l
■ S 2222 0.20 mmol/l
△ S 2222 0.25 mmol/l
○ S 2222 0.3 mmol/l
◇ S 2222 0.5 mmol/l

Abschließend wurde untersucht, inwieweit die gereinigte AT III-Präparation durch das AT III in EDTA-Plasma ersetzbar ist.

Prinzip siehe 3.12 und 3.13.1. Tabelle 24 und Abbildung 25 zeigen die Ergebnisse.

Tabelle 24: Substratumsatz als Funktion der Substratkonzentration mit und ohne F X_a-Hemmung durch EDTA-Plasma
F X_a: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [ml•min/µmol]
Leerwert F X_a (EDTA-Plasma durch Puffer ersetzt)			
1	0.263	1	3.79
0.5	0.232	2	4.29
0.25	0.166	4	5.99
0.125	0.102	8	9.72
K_M = 0.32 mmol/l; v_{max} = 0.37 µmol/ml x min			
Hauptwert F X_a; EDTA-Plasma			
1	0.259	1	3.84
0.5	0.170	2	5.85
0.25	0.102	4	9.72
0.125	0.062	8	16.17
K_M = 0.75 mmol/l; v_{max} = 0.42 µmol/ml x min			

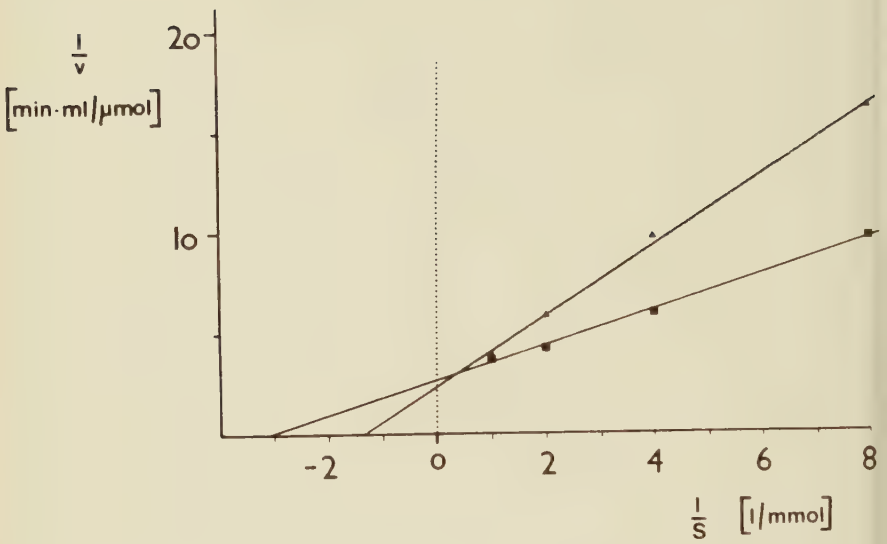


Abb. 25: Substratumsatz als Funktion der Substratkonzentration in der doppelt reziproken Darstellung nach LINEWEAVER-BURK mit und ohne F X_a-Hemmung durch EDTA-Plasma

■ Leerwert F X_a, Puffer
▲ Hauptwert F X_a, Puffer, EDTA-Plasma

4.9 Wirkung von Heparin auf die Faktor X_a-Aktivität

Methoden siehe 3.11 und 3.13.1. Tabelle 25 zeigt die Versuchsergebnisse.

Tabelle 25: Substratumsatz als Funktion der Substrat- und Heparinkonzentration

F X_a: 1,42 nkat/Test

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
Heparin 0 U/ml			
1	0.287	1	3.48
0.5	0.259	2	3.84
0.25	0.182	4	5.48
0.125	0.116	8	8.59
K_M = 0.29 mmol/l; v_{max} = 0.39 µmol/ml x min			
Heparin 1.5 U/ml			
1	0.310	1	3.22
0.5	0.259	2	3.84
0.25	0.178	4	5.60
0.125	0.112	8	8.88
K_M = 0.35 mmol/l; v_{max} = 0.43 µmol/ml x min			
Heparin 3.1 U/ml			
1	0.302	1	3.30
0.5	0.271	2	3.68
0.25	0.178	4	5.60
0.125	0.108	8	9.20
K_M = 0.39 mmol/l; v_{max} = 0.45 µmol/ml x min			

Fortsetzung Tabelle 25

Substratkonz. S [mmol/l]	Geschwindigk. v [µmol/ml•min]	$\frac{1}{S}$ [l/mmol]	$\frac{1}{v}$ [min•ml/µmol]
Heparin 6.2 U/ml			
1	0.318	1	3.14
0.5	0.271	2	3.68
0.25	0.178	4	5.60
0.125	0.116	8	8.59
K_M = 0.34 mmol/l; v_{max} = 0.44 µmol/l x min			
Heparin 12.5 U/ml			
1	0.318	1	3.22
0.5	0.271	2	3.68
0.25	0.162	4	6.13
0.125	0.104	8	9.54
K_M = 0.43 mmol/l; v_{max} = 0.46 µmol/ml x min			
Heparin 25 U/ml			
1	0.310	1	3.22
0.5	0.232	2	4.29
0.25	0.135	4	7.36
0.125	0.081	8	12.27
K_M = 0.69 mmol/l; v_{max} = 0.53 µmol/ml x min			

Abbildung 26 und 27 zeigen die Abhängigkeit der K_M bzw. der v_{max} von der Heparinkonzentration.

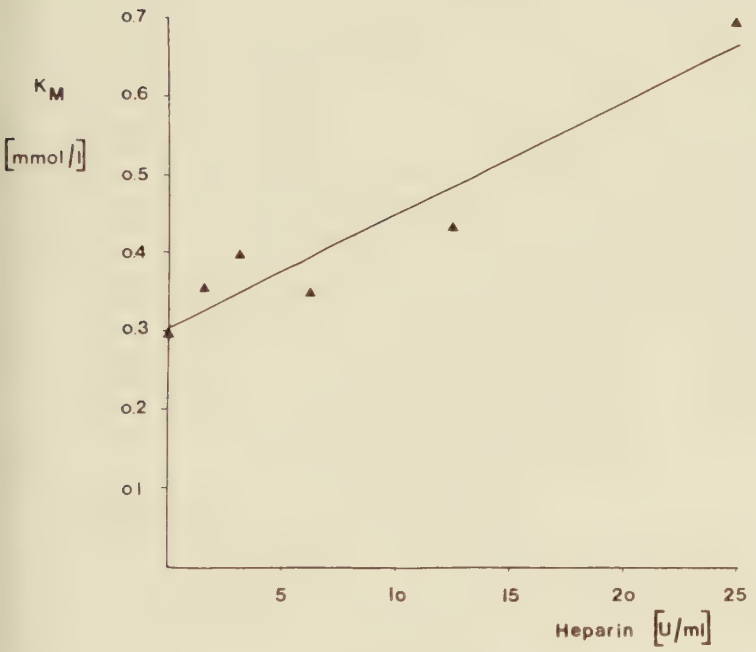


Abb. 26: MICHAELIS-Konstante als Funktion der Heparinkonzentration bei konstanter F X_a-Konzentration (1,42 nkat/Test)

Sowohl K_M als auch v_{max} werden bei Präinkubation von F X_a mit Heparin erhöht. Die Erhöhung der K_M ist quantitativ vergleichbar mit der Steigerung bei Hemmung des Enzyms durch AT III (siehe Abb. 16), bleibt jedoch weit hinter der durch den AT III-Heparin-Komplex erzielten zurück (siehe Abb. 23).

Bei Inkubation von S 2222 mit einer Heparin-Puffer-Lösung und Start der Reaktion mit heparinfreiem Faktor X_a wurde keine Beeinflussung der kinetischen Konstanten gefunden. Als maximal möglich erwies sich hierbei eine Heparinkonzentration von 0,125 U/Test. Bei höheren Konzentrationen fiel S 2222 aus.

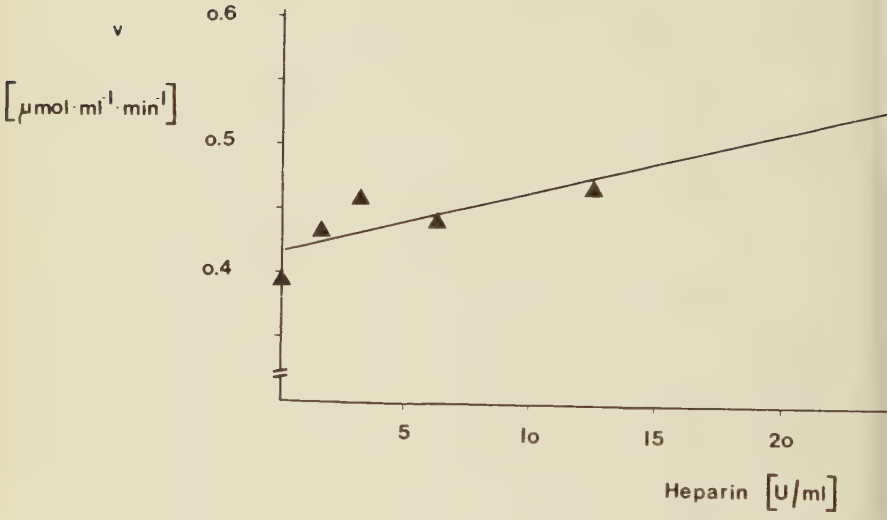


Abb. 27: Maximalgeschwindigkeit als Funktion der Heparinkonzentration bei konstanter F X_a-Aktivität (1,42 nkat/Test

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Typ der Hemmung von F X_a durch AT III aufzuklären. Hierzu war es erforderlich, die kinetischen Konstanten K_M und v_{max} der F X_a-S 2222-Wechselwirkung zu bestimmen.

Mit dem zunächst verwendeten kalziumhaltigen Puffer (siehe 3.2.2) konnte die in der Literatur (37) angegebene K_M von 0.3 mmol/l nicht bestätigt werden. Abhängig von der Enzymaktivität wurde eine K_M gefunden, die zwischen 2.47 und 4.13 mmol/l schwankte (Tabelle 3). Da das Enzym in kalziumhaltigem Puffer verdünnt wurde und sich daher gleichzeitig mit der Enzymkonzentration auch die Kalziummenge im Test änderte, wurde die K_M vergleichend in kalziumfreiem Puffer (siehe 3.2.1) und kalziumhaltigem Puffer bestimmt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen der K_M als auch der v_{max} (siehe Abb. 8).

Die im kalziumarmen Milieu bei verschiedenen Enzymaktivitäten bestimmte K_M wies einen von der Enzymaktivität unabhängigen Wert von 0.422 mmol/l (s = 0.029 mmol/l, VK = 6,8 %) auf (siehe Abb. 9 und Tab. 5a). Auch konnte ausschließlich in kalziumarmen Milieu eine lineare-proportionale Beziehung zwischen Enzymaktivität und Substratumsatz bei konstanter Substratkonzentration nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). Das Fehlen einer derartigen Beziehung bei Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen wird aus Tabelle 6 deutlich.

Der Einfluß von Kalziumionen auf die Enzymaktivität wurde anschließend quantifiziert. Bei einer Endkonzentration der Kalziumionen von 5 mmol/l im Test fand sich eine maximale Steigerung der Enzymaktivität; bei weiterer Erhöhung der Kalziumionenkonzentration sank die Enzymaktivität wieder kontinuierlich ab, ohne jedoch Werte wie im kalziumarmen Milieu zu erreichen (siehe Abb. 10).

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Kooperation von Kalziumionen mit Faktor X_a (38, 39, 40):

ORTHNER et al. (38) zeigten 1978, daß sich in Anwesenheit von Kalziumionen die K_M von Faktor X_a, gemessen mit S 2222, erniedrigte, während die v_{max} weitgehend unbeeinflußt blieb. ORTHNER et al. schlossen daraus, daß Kalziumionen die Affinität von F X_a zu S 2222 erhöhen ohne in den katalytischen Prozeß einzugreifen.

Andere Autoren (39) fanden keinen Einfluß von Kalziumionen auf die amidolytische Aktivität von F X_a.

AURELL et al (40) konnten eine deutliche Abhängigkeit der F X_a-Aktivität von der Kalziumionenkonzentration nachweisen. Sie fanden einen maximalen Substratumsatz bei 5 mmol/l. Unter diesen Bedingungen bestimmten sie eine K_M von 0.5 mmol/l in einem TRIS-Puffer-haltigem System.

Im Gegensatz zu den Befunden von ORTHNER et al. (38) konnten wir nachweisen, daß Kalziumionen die Aktivität von F X_a bei einer Konzentration von 5 mmol/l etwa verdoppeln. Unsere Befunde stimmen in dieser Hinsicht gut mit denen von AURELL et al. (40) überein. Jedoch konnten wir die von diesen Autoren gefundene niedrige K_M im kalziumhaltigen Milieu nicht bestätigen. Unseren Befunden zufolge wird die K_M durch Kalziumionen erhöht (im Fall des in Abb. 8 dargestellten Versuchs um den Faktor 5,7).

Es ist bekannt, daß Kalziumionen erforderlich sind, damit F X_a in vivo aktiv sein kann. Diese Kalziumionen vermitteln über γ-Carboxyglutaminsäurereste eine Komplexbindung von F X_a an Phospholipide, die eine Reaktionsmatrix für die Prothrombinaktivierung darstellen. Eine direkte Wirkung auf das aktive Zentrum von F X_a besteht nicht (64, 54).

Bei der Spaltung des Kunstsubstrates S 2222 durch F X_a ist eine derartige Fixierung an eine Reaktionsmatrix nicht erforderlich. Die Tatsache, daß die Reaktion von S 2222 mit F X_a dennoch durch Kalziumionen zu beeinflussen ist, weist darauf hin, daß das F X_a-Molekül noch über weitere Ca^{++}-Bindungsstellen verfügen muß, von denen aus auch das aktive Zentrum des Enzyms beeinflußt werden kann. Die von uns gefundene Erhöhung sowohl der K_M als auch der v_{max} spricht für eine Aktivitätssteigerung von F X_a durch Kalziumionen.

Als Konsequenz daraus ergab sich, daß in den Testsystemen möglichst wenig Kalzium enthalten sein durfte, da für kinetische Untersuchungen eine Substratkonzentration von mindestens dem zehnfachen der K_M gefordert wird, um Unlinearitäten des Substratumsatzes durch vorzeitige Substraterschöpfung zu vermeiden.

Da die K_M im kalziumreichen Milieu je nach Enzymverdünnung zwischen 2.47 und 4.13 mmol/l schwankt (Tabelle 3), wäre in diesem Fall eine Substratkonzentration von mindestens 24 mmol/l im günstigsten Fall erforderlich. Bei einer K_M von 0.422 mmol/l im kalziumarmen System (siehe Abb. 9) ist jedoch eine Substratkonzentration von 4.22 mmol/l ausreichend.

Da das Substrat S 2222 nur zu 6 mmol/l löslich ist, ist ein ausreichender Substratüberschuß nur bei weitgehender Kalziumfreiheit des Systems zu erzielen. Wir senkten daher durch erschöpfende Dialyse die Kalziumkonzentrationen in den von uns verwendeten F X_a- und AT III-Präparationen auf Werte kleiner als 1 mmol/l (55).

Der Nachteil dieser Verfahrensweise besteht darin, daß die gefundenen Ergebnisse nur bedingt auf in vivo-Verhältnisse übertragbar sind.

Nach Ermittlung der kinetischen Konstanten K_M und v_{max} studierten wir die Hemmung von Faktor X_a durch AT III als Funktion der Zeit. Bei Verwendung von kalziumhaltigem Puffer (Abb. 11) wurde

- keine befriedigende Endhemmung und

- ein starker Aktivitätsverlust von F X_a (35 % nach 1465 min)

gefunden.

Die weiteren Hemmversuche wurden daher im kalziumarmen Milieu durchgeführt. Aus Abb. 12 geht hervor, daß

- der Leerwert stabil ist, die Autodestruktion des Enzyms also wahrscheinlich ein Kalziumeffekt war. Zu diskutieren ist auch ein F X_a-Aktivitätsverlust durch bakterielle Zersetzung des Enzyms in den Fällen der Tabellen 7 und 8. Dies kann nicht sicher ausgeschlossen werden, da kein Bakteriostatikum zugesetzt wurde. Da jedoch bei allen Versuchen im kalziumarmen Milieu eine während der gesamten Versuchsdauer stabile F X_a-Aktivität im Leerwert gefunden wurde, erscheint eine bakterielle Zersetzung wenig wahrscheinlich.

- keine exakte Endhemmung erreicht wird und

- eine lineare Beziehung zwischen der AT III-Konzentration im Test und der F X_a-Restaktivität besteht.

In der halblogarithmischen Darstellung (Abb. 28, Daten aus Tabelle 10) wird deutlich, daß nach etwa 100 min Unlinearitäten auftreten, die

- auf eine Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes,

- auf eine Änderung der Reaktionsordnung,

- auf eine Verunreinigung der verwendeten Enzym- bzw. Inhibitorpräparationen oder

- auf das Vorhandensein einer zweiten Geschwindigkeitskonstanten der F X_a-AT III-Wechselwirkung

schließen lassen.

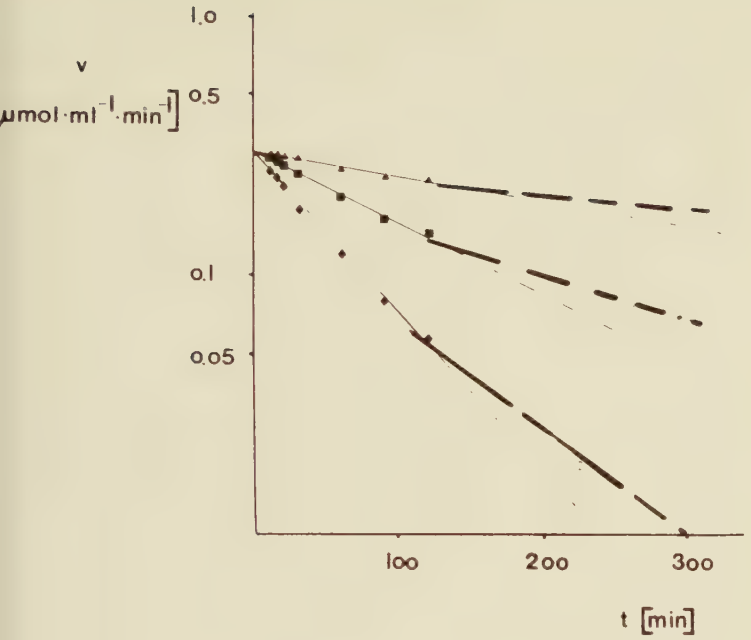


Abb. 28: Hemmung von Faktor X_a durch AT III als Funktion der Zeit in halblogarithmischer Darstellung

Dreiecke: AT III-Konzentration 2.5 x 10^{-3} U/Test
Vierecke: AT III-Konzentration 5.0 x 10^{-3} U/Test
Rauten: AT III-Konzentration 1.0 x 10^{-2} U/Test

Daten aus Tabelle 10

Da im Verlauf der Hemmung Antithrombin III irreversibel an Faktor X_a gebunden wird (8), ist eine Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes als Ursache der in der Endphase langsamer verlaufenden Hemmung ausgeschlossen.

Jedoch ist durch kontinuierliche Konzentrationsabnahme der Reaktanten eine Änderung der Reaktionsordnung möglich.

ØDEGARD et al. (51) fanden bei der Inaktivierung von Faktor X_a durch AT III eine Reaktion 2. Ordnung.

STÖRZEBECHER (42) fand einen Reaktionstyp erster Ordnung für die Hemmung von F X_a, Thrombin und Plasmin durch AT III.

Allerdings verwendete er AT III im Oberschuß und führte Messungen nur über einen Zeitraum von 5 min durch. Es handelt sich daher bei seinen Befunden um eine "pseudounimolekularen" Mechanismus, der die Reaktionsordnung bei äquimolaren Konzentrationen von F X_a und AT III nicht exakt wiedergibt. Ähnliches gilt für die Untersuchungen von DAMUS et al. (9) bezüglich Faktor XI_a und ØSTERUD et al. (41) bezüglich F X_a.

Da jedoch auch der zweite, langsamere Teil der F X_a-Hemmung durch AT III den Gesetzen einer Reaktion erster Ordnung folgt (siehe Abb. 28), ist das Hintereinander zweier Hemmkinetiken mit jeweils unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten die wahrscheinlichste Erklärung für den in Abb. 28 dargestellten Kurvenverlauf. Einer initial schnell ablaufenden Hemmung mit geringer Halbwertszeit (ausgefüllte Symbole) folgt eine langsamer ablaufende Inhibition mit höherer Halbwertszeit der F X_a-Restaktivität (nicht ausgefüllte Symbole in Abb. 28).

In Tabelle 26 sind die für die einzelnen Phasen der in Abb. 28 dargestellten Inhibition zutreffenden Halbwertszeiten der F X_a-Restaktivität aufgeführt.

Tabelle 26: Halbwertszeichen der F X_a-Restaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit t_i und der AT III-Konzentration (Daten aus Tab. 10 und Abb. 28).

$\triangle t_i$ [min]	AT III-Konzentration [U/Test]		
	$2{,}5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	1×10^{-2}
3-90	240	104	44
90-297	430	164	70

Im Durchschnitt ist die Halbwertszeit der F X_a-Restaktivität in der zweiten Phase der Inhibition um den Faktor 1,65 verlängert (Daten aus Tabelle 26).

Die Ursache dieser Erscheinung ist mit der von uns gewählten Versuchsanordnung nicht zu klären.

Anhand unserer Hemmversuche berechneten wir eine Wechselzahl von etwa 4.000/min für Faktor X_a (siehe 4.4). RUSTIGE et al. fanden durch gelelektrophoretische Untersuchungen (58), daß 71 nkat der verwendeten F X_a- Präparation einer F X_a-Proteinmenge von 8.4 mg entsprechen.

Nach BERGMEYER (61) wird die Wechselzahl aus der spezifischen Aktivität eines Enzyms wie folgt berechnet:

$$\text{Wechselzahl} = \frac{V \times MW}{1.000 \times \varepsilon X \; d \times v \times c_{Protein}} \times \frac{\triangle E}{t}$$

V = Testvolumen (ml)
v = Probevolumen (ml)
MW = Gewicht eines Mikromols (µg)
ε = mikromolarer Extinktionskoeffizient
d = Schichtdicke (cm
c = Konzentration (µg/ml)
E = Extinktion
t = Zeit (min)

Nach Einsetzen der Daten aus 4.1 und Tabelle 10 ergibt sich:

$$\text{Wechselzahl} = \frac{0.6 \times 61.000}{1.000 \times 10.26 \times 1 \times 0.3 \times 1.68 \times 10^{-3}} \times 1.618$$

$$\text{Wechselzahl} = 11.452$$

Diese rechnerisch ermittelte Wechselzahl übersteigt die von uns durch Hemmversuche auf dem Weg über die Inhibitorkonzentration ermittelte um nahezu den Faktor 3. Diese Diskrepanz ist durch die immunologische Bestimmung der AT III-Konzentration, die den Aktivitätszustand nicht erfaßt, zu erklären.

Aller Wahrscheinlichkeit nach sind nicht alle in einen Test eingebrachten AT III-Moleküle aktiv. Da wir jedoch in der in Punkt 4.4 dargestellten Berechnung von einer 100 %igen Aktivität ausgehen mußten, ist die Zahl der für die gemessene Umsatzdifferenz veranschlagten F X_a-Moleküle zu hoch, die Wechselzahl von F X_a mit dem Kunstsubstrat S 2222 daher zu gering berechnet.

Unter Berücksichtigung dieser Zusammenhänge muß man von einer realen F X_a-Wechselzahl im Bereich zwischen 4.000 und 11.000/min ausgehen.

Die zeitabhängige Hemmung von F X_a durch AT III wird durch Heparin beschleunigt (Tab. 11, 12, 13, Abb. 13), wobei die katalytische Wirkung des Heparins auf AT III selbst nicht zeitabhängig ist (siehe 4.6).

In Tabelle 11 (Verhältnis der Einheiten AT III : Hep = 1 : 28) wird die Hemmung zwar in der Anfangsphase ($\triangle t_i$ 0-40 min) um den Faktor 1,5 beschleunigt, jedoch ist in der Endphase ($\triangle t_i$ 65-219 min) keine exakte Beurteilung mehr möglich, da nach Zugabe von S 2222 eine Fällungsreaktion auftrat.

Nach Reduktion der Heparinkonzentration (Verhältnis der Einheiten AT III : Hep = 1 : 6,2) trat keine Ausfällung mehr auf (Tabelle 12). Die Hemmung wurde in der Anfangsphase (t_i bis 90 min) durch Heparin um den Faktor 1,23, in der Endphase ($\triangle t_i$ 90-230 min) um den Faktor 1,41 beschleunigt.

Reduktion der AT III-Konzentration führte bei unverändertem Verhältnis AT III zu Heparin (Tabelle 13) zu einer deutlich verminderten Beschleunigung der Hemmung durch Heparin (Faktor 1,1 im Zeitraum t_i bis 165 min, Faktor 1,02 im Zeitraum t_i 300-1.400 min).

Daraus ergibt sich, daß die Wirkung von Heparin mit steigender AT III-Konzentration zunimmt. Dies wird auch durch Abb. 31 (s. u.) bestätigt.

Sobald das Verhältnis der Einheiten AT III zu Heparin 1 : 7 überschritt, fiel das Substrat S 2222 durch Komplexbildung mit Heparin aus. Dieses Verhalten chromogener Kunstsubstrate wurde bereits von anderen Autoren beobachtet (43, 14).

Die Hemmversuche von ROSENBERG et al.(8) für das System Thrombin-AT III-Heparin weisen auf eine Erhöhung der AT III-Kapazität unter Heparinkatalyse hin. Jedoch ist bei diesen Versuchen wegen zu kurzer Inkubationszeiten das heparinfreie und das heparinkatalysierte System nicht exakt vergleichbar. Aus Abb. 13 geht hervor, daß erst nach 1.200 min sowohl mit als auch ohne Heparinkatalyse vergleichbar große F X_a-Restaktivitäten erreicht werden.

YIN (7) zeigte bereits 1971 die Möglichkeit der Beschleunigung der AT III-vermittelten Hemmung des Faktors X_a durch Heparin. Abgesehen von einem deutlicher ausgeprägtem Heparineffekt stimmen seine Befunde gut mit den unsrigen überein. Im Gegensatz zu unserem Versuchsansatz setzte er AT III im Oberschuß ein, so daß die F X_a-Restaktivität sowohl mit als auch ohne Heparinkatalyse innerhalb kürzester Zeit gegen null strebt und der Heparineffekt wesentlich stärker ausgeprägt erscheint.

Die beschleunigende Wirkung von Heparin auf die F X_a-Hemmung durch AT III wird auch aus Abbildung 14 deutlich. Die Zeit die vergeht, bis sich eine konstante F X_a-Restaktivität einstellt, ist eine Funktion der Heparinkonzentration.

Die AT III-Konzentration beträgt in diesem Versuch das 200-fache wie im Fall der Tabelle 13. Entsprechend stark ausgeprägt ist die inhibitionsbeschleunigende Wirkung von Heparin, erkennbar an der wesentlich früher einsetzenden Reduktion der p-NA-Freisetzung in den Fällen der Kurven 3, 4 und 5 im Vergleich zu Kurve 2.

Da die Steigungen der Geraden 4 und 5 im Endverlauf der Hemmung gleich sind, d. h. die F X_a-Restaktivitäten unabhängig von der Heparinkonzentration bei gleicher Antithrombin III-Konzentration identisch sind, kann Heparin keine Kapazitätsänderung von AT III bewirkt haben.

Die Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III ist daher wie folgt charakterisiert:

- Die Inhibitionsgeschwindigkeit ist gering, was durch den Begriff "progressives Antithrombin" zum Ausdruck kommt.

- Einer initial schnell ablaufenden Hemmung folgt eine zweite langsamere Phase. Beide Abschnitte folgen den Gesetzen einer Reaktion 1. Ordnung.

- Die Geschwindigkeit der Enzyminaktivierung wird durch Heparin erhöht.

- Das Ausmaß der katalytischen Wirkung von Heparin ist abhängig von der eingesetzten AT III-Konzentration.

- Heparin bewirkt keine Änderung der Hemmkapazität von AT III.

- Der Enzym-Inhibitor-Komplex dissoziiert unter den gewählten Bedingungen nicht.

Ober den Mechanismus der Inhibition von Faktor X_a durch Antithrombin III besteht Unklarheit. Zwei grundsätzliche Möglichkeiten bieten sich an:

1. Die non-kompetitive Hemmung (Abb. 29). Substrat und Inhibitor werden an unterschiedlichen Stellen des Enzymmoleküls gebunden.

   Die Inhibition wird in diesem Fall durch eine sterische Behinderung des Enzyms erzeugt. Im LINEWEAVER-BURK- Diagramm findet man eine Abnahme der Maximalgeschwindigkeit bei konstanter K_M als Ausdruck dafür, daß einige Enzymmoleküle durch den Inhibitor reversibel inaktiviert wurden, was den Abfall

der v_{max} erklärt, daß aber die Affinität der restlichen Enzymmoleküle zu dem Substrat gleichgeblieben ist, was durch die unveränderte K_M bestätigt wird.

Eine Erhöhung der Substratkonzentration bewirkt in diesem Fall keine Verdrängung des Inhibitors.

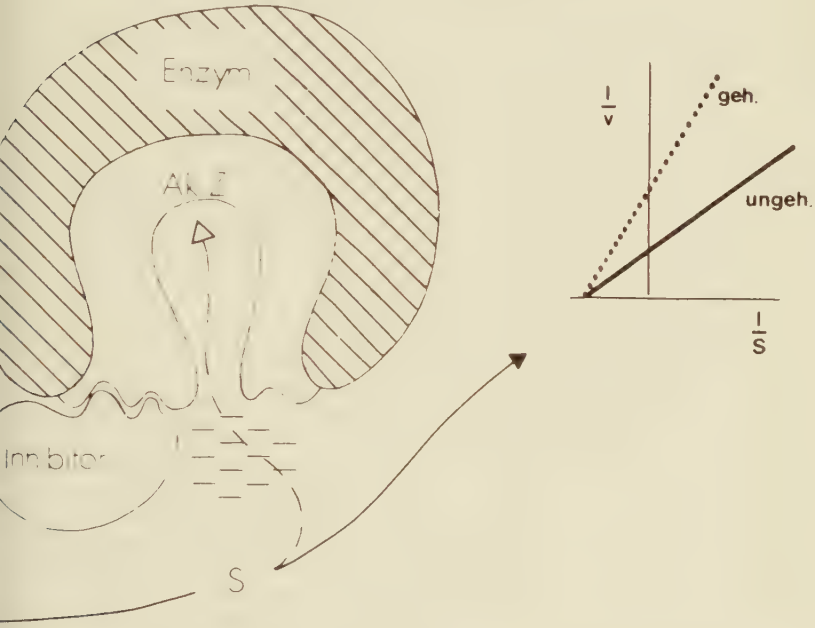


Abb. 29: Abschirmung des aktiven Zentrums des Enzyms durch ein elektrisches Feld, das durch Bindung des Inhibitors außerhalb des aktiven Zentrums aufgebaut wird und das Eindringen des Substrates in die "Tasche" des aktiven Zentrums verhindert

2. Die kompetitive Hemmung (Abb. 30); Substrat und Inhibitor konkurrieren um das aktive Zentrum des Enzyms. In diesem Fall bleibt die v_{max} unverändert, die K_M erhöht sich jedoch, was bedeutet, daß jetzt mehr Substrat eingesetzt werden muß, um die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion zu erreichen, da die Affinität des Enzyms zum Substrat durch Blockierung des aktiven Zentrums gesenkt wurde. Hohe Substratkonzentrationen können den Inhibitor vom aktiven Zentrum verdrängen.

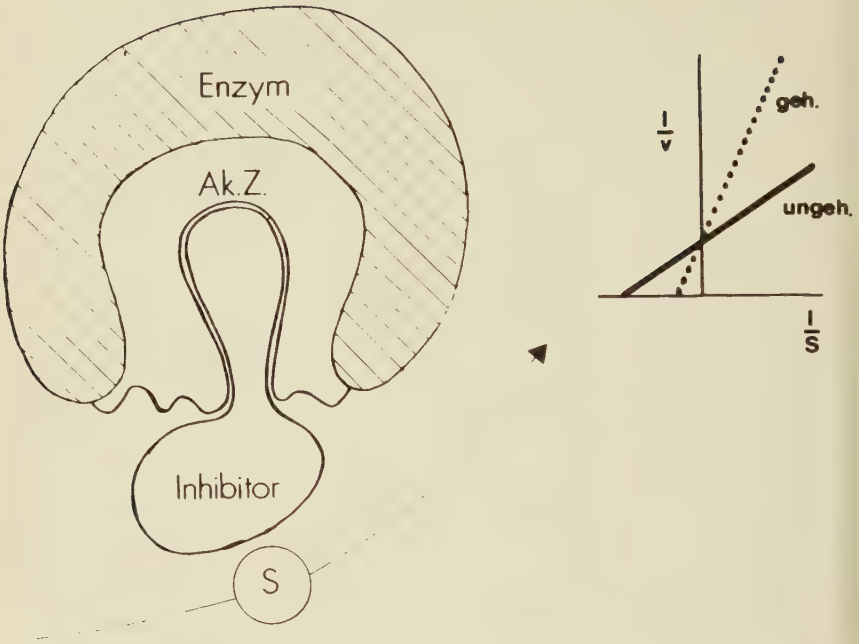


Abb. 30: Kompetitive Hemmung. Der Inhibitor blockiert durch Anlagerung das aktive Zentrum des Enzyms

In der Vergangenheit - in allerdings nicht kinetischen Untersuchungen - erhobene Befunde sprechen für eine Kompetition, also für den letztgenannten Mechanismus. So konnte ROSENBERG (8) zeigen, daß Antithrombin III die Serylproteasen inaktiviert, indem es durch einen Arginylrest an das Serin im aktiven Zentrum dieser Enzyme gebunden wird.

Dennoch wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt, die in eine andere Richtung weisen.

AOKI (31) zeigte am Beispiel des Thrombin, KLASING et al. (56) am Beispiel des Faktor X_a einen non-kompetitiven Hemmtypus.

Bei genauer Betrachtung der betreffenden Versuche zeigt sich jedoch, daß AT III mit Faktor X_a vorinkubiert und das System mit Substrat gestartet wurde. Das bedeutet, daß eine unmittelbare Konkurrenz des Inhibitors mit dem Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms nicht erfolgt war, da bereits in der Phase der Vorinkubation vor Hinzufügen des Substrates Antithrombin III mit F X_a irreversibel komplexiert war. Das bedeutet, daß in den Versuchen von KLASING et al. und AOKI eine Faktor X_a-Restaktivität bestimmt wurde. Zudem lag der Inhibitor in geringer Konzentration im Vergleich zum Substrat vor.

Wir führten daher folgende Änderungen der Testbedingungen durch (siehe auch 3.8 und 3.9):

1. Die Konzentration von AT III wurde der des Substrates angeglichen.

2. Eine Kompetition von Inhibitor und Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms wurde ermöglicht, indem der Inhibitor mit dem Substrat vorinkubiert und die Reaktion mit Faktor X_a gestartet wurde. Sofort im Anschluß daran wurde der Umsatz von S 2222 bestimmt.

Aus Abb. 15 wird deutlich, daß die Hemmung unter diesen Bedingungen dem kompetitiven Typ folgt, erkennbar an der unveränderten Maximalgeschwindigkeit bei gestiegener K_M.

Dabei ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der K_M von der AT III-Konzentration (siehe Abb. 16). Bei ausreichender AT III-Konzentration im Test würde die K_M daher unendlich groß werden, d.h. bei endlichen Substratkonzentrationen würde wegen der Blockade des aktiven Zentrums von F X_a kein Umsatz stattfinden. Die Konzentration von AT III im Testsystem ist jedoch durch eine Löslichkeitsgrenze von 10 U/ml dieses Proteins limitiert.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Heparin die Hemmung der Serylproteasen durch AT III katalysiert (47). Da wir zudem nachweisen konnten, daß Heparin die Kapazität von AT III nicht verändert (siehe oben), setzten wir Heparin als biologischen Katalysator der Reaktion ein.

Aus Abbildung 19 geht im Vergleich zu Abb. 15 hervor, daß die Erhöhung der K_M gegenüber der reinen AT III-Hemmung gesteigert ist. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen, daß die K_M in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration bei konstanter AT III-Konzentration eine gegen einen Grenzwert strebende Funktion ist, wobei bereits geringe Heparinmengen - bei hoher AT III-Ausgangskonzentration - eine deutliche Effektivierung der Hemmung von F X_a bewirken, die ihr Maximum bei einem Verhältnis der Einheiten AT III zu Heparin von 1 : 5 erreicht. Mehr Heparin bewirkt keine weitere Erhöhung der K_M. Als technisch mögliches Maximum fanden wir ein Verhältnis der Einheiten Heparin zu AT III wie 7,5 : 1, was einem molaren Verhältnis von 1 : 2 entspricht. Bei größeren Heparinkonzentrationen trat eine Fällungsreaktion, wahrscheinlich bedingt durch das Substrat S 2222 (43, 14), auf.

Dies und der e-funktionelle Verlauf der Kurve in den Abbildungen 20 und 21 weisen darauf hin, daß bei dieser Heparinkonzentration die von ROSENBERG (8) beschriebenen Lysinbindungsstellen an AT III für Heparin abgesättigt sind.

In einem weiteren Versuch konnte der kompetitive Hemmtyp für wechselnde AT III-Konzentrationen bei maximaler Heparinaktivierung nachgewiesen werden (siehe Abb. 22). In diesem Fall besteht eine lineare Abhängigkeit der K_M von der AT III-Konzentration, vergleichbar der in Abb. 16.

Bei einem Vergleich der K_M-Vergrößerung als Funktion der AT III-Konzentration mit und ohne Heparin wird die katalytische Funktion von Heparin sowie deren Abhängigkeit von der eingesetzten AT III-Konzentration deutlich (Abb. 31). Die bei den zeitabhängigen Hemmversuchen beobachtete geringe Heparinwirkung (siehe oben) wird somit durch die dort eingesetzte niedrige AT III-Menge (5×10^{-2} bzw. $2{,}5 \times 10^{-11}$ U/ml, siehe Tabelle 11, 12, 13) erklärt.

Die Wirkung von Heparin ist also charakterisiert durch

- eine Effektivierung und Beschleunigung der F X_a-Hemmung durch AT III

- eine Abhängigkeit von der eingesetzten AT III-Konzentration.

In der Literatur besteht Uneinigkeit darüber, ob Heparin seine katalytische Funktion bei der AT III-vermittelten Hemmung der Serylproteasen durch Bindung an den Inhibitor (44, 45, 46, 48, 49, 50) oder durch Bindung an das Enzym (65, 66) entfaltet.

Für eine Bindung an AT III spricht, daß bei dem von uns gewählten Versuchsansatz (Präinkubation von AT III, Heparin und Substrat und Start der Reaktion mit F X_a) eine Effektivierung der Hemmung erzielt wurde (Abb. 20, 21, 31) und daß S 2222 bei hohen Heparinkonzentrationen nur in Abwesenheit von AT III ausfällt (Abb. 18). Die gleichen Heparinmengen werden in AT III-haltigem Milieu ohne Ausfällung des Substrates toleriert.

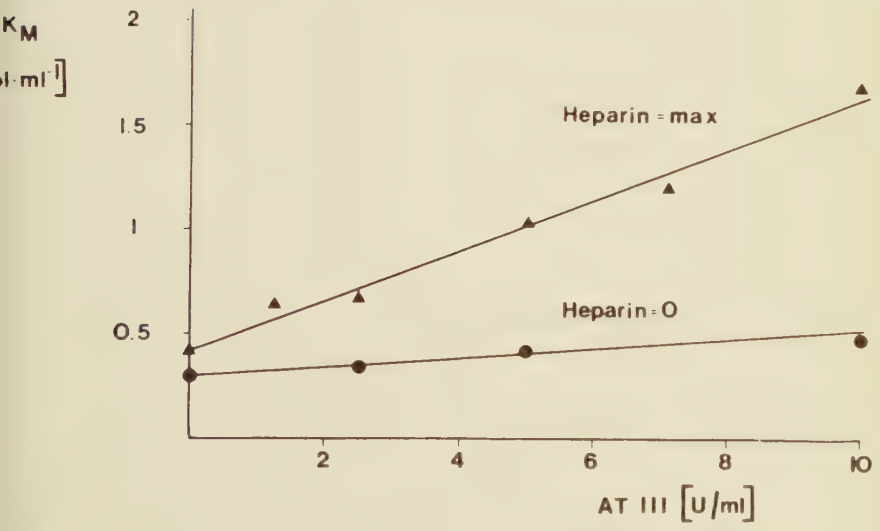


Abb. 31: Abhängigkeit der K_M von der AT III-Konzentration mit und ohne Heparinkatalyse

Daten zusammengestellt aus Abb. 16 und 23.

Demnach konnten wir einen Einfluß von Heparin auf F X_a nachweisen.

In Abbildung 19 und 22, die als Ausdruck einer kompetitiven Hemmung interpretiert wurden, findet sich auch eine Erhöhung der v_{max}, die einer Kompetition widerspricht.

Es konnte gezeigt werden, daß diese Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit durch einen aktivitätssteigernden Effekt von Heparin auf F X_a entsteht.

Aus den Abbildungen 26 und 27 geht hervor, daß die K_M und die v_{max} durch Heparin gesteigert werden. Heparin muß dabei an Faktor X_a gebunden werden, da eine Vorinkubation von Substrat und Heparin bei anschließendem Start der Reaktion mit F X_a die kinetischen Konstanten nicht veränderte und bei Anwesenheit von F X_a im Testsystem etwa die zwanzigfache Heparin/-Konzentration toleriert wird, ohne daß S 2222 ausfällt.

Daraus geht hervor, daß Heparin - ähnlich wie Kalziumionen - durch Bindung an Faktor X_a eine Aktivitätssteigerung bewirkt.

Faßt man die bis hier dargestellten Ergebnisse in einem Modell zusammen, so ist die Wechselwirkung zwischen F X_a, AT III und Heparin wie folgt charakterisiert:

1. Die initiale Hemmung folgt dem kompetitiven Typ.

2. Heparin wirkt als Katalysator, indem es einen beschleunigenden Effekt auf die F X_a-Hemmung durch Bindung an AT III ausübt.

3. Freies Heparin hat zudem einen aktivierenden Effekt auf Faktor X_a.

4. Mit zunehmender Dauer der Hemmung ändert sich der Inhibitionstyp im Sinne einer non-kompetitiven Hemmung.

5. Diese Annahme ist jedoch virtuell, da die gebildeten bimolekularen Enzym-Inhibitor-Komplexe nicht dissoziieren

und daher dem System ständig Enzym entzogen wird, was die erreichbare Maximalgeschwindigkeit vermindert. Als Folge dieses stetigen Enzymverlustes scheint die Hemmung nonkompetitiv zu sein.

6. Antithrombin III ist demnach ein sogenannter "dead-end-inhibitor", der durch Änderung seiner Tertiärstruktur nach Bindung an das Enzym eine Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes nicht zuläßt (siehe Abb. 32).

Der kompetitive Hemmtyp und die katalytische Rolle von Heparin konnten durch eine Auftragung unserer Daten nach DIXON bestätigt werden (siehe 3.13.2).

Die dabei gefundene K_i gibt die Inhibitorkonzentration an, die erforderlich ist, um eine enzymatisch katalysierte Reaktion halbmaximal zu hemmen (52) oder - anders ausgedrückt - die K_i ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (2).

Das bedeutet, je kleiner K_i ist, desto weniger Inhibitor wird benötigt, um einen definierten Grad der Hemmung zu erreichen.

Bei einer reinen AT III-Hemmung (siehe Abb. 15) lag der Schnittpunkt S der Geraden im linken oberen Quadranten, was auf eine kompetitive Hemmung hinweist. Die K_i betrug 19.64 U AT III/ml (= 1.44×10^{-7} mol AT III/ml).

Bei maximaler Beschleunigung durch Heparin (Abb. 24) blieb die Lage des Schnittpunktes S erhalten, lediglich die K_i sank auf einen Wert von 5.2 U AT III/ml (= 3.81×10^{-8} mol AT III/ml).

Die in beiden Fällen gefundenen Maximalgeschwindigkeiten sind sowohl untereinander als auch mit den nach dem Verfahren von LINEWEAVER-BURK ermittelten Werten identisch.

Daraus geht hervor:

1. Die Hemmung von F X_a durch AT III ist kompetitiv.

2. Dies ändert sich nicht unter Heparinkatalyse.

3. Heparin senkt die K_i und wirkt daher als Katalysator der Hemmung von F X_a durch AT III.

Man könnte einwenden, daß sich der irreversible Charakter der Hemmung und das Auftreten einer K_i - die als Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes definiert ist - widersprechen.

Dieser Widerspruch läßt sich erklären, indem man vor Ausbildung des kovalent gebundenen Enzym-Inhibitor-Komplexes einen erst locker gebundenen, noch rückdissoziablen Komplex annimmt (53).

Sowohl die Methode nach LINEWEAVER-BURK als auch die nach DIXON weisen auf einen kompetitiven Mechanismus der Faktor X_a-Hemmung durch AT III hin. Das Enzym Faktor X_a ist wegen Ähnlichkeiten in der Struktur zwischen dem Substrat und dem Inhibitor nicht in der Lage, diese beiden Proteine zu diskriminieren.

AT III enthält drei Arg-Val-Bindungen, von denen eine von vier Histidyl- und einem Arginylrest (tentative Aminosäuren des aktiven Zentrums (siehe Abb. 2)) umgeben ist. Nach Spaltung dieser Arg-Val-Bindung durch F X_a und Abspaltung des ersten hydrolytischen Produktes ändert AT III seine räumliche Struktur, so daß durch Hydrophobisierung der Acylbindung die hydrolytische Spaltung dieser Bindung unmöglich wird, wodurch der Abwurf des zweiten hydrolytischen Produktes und damit des Enzyms nicht mehr möglich ist (54) (siehe Abbildung 32).

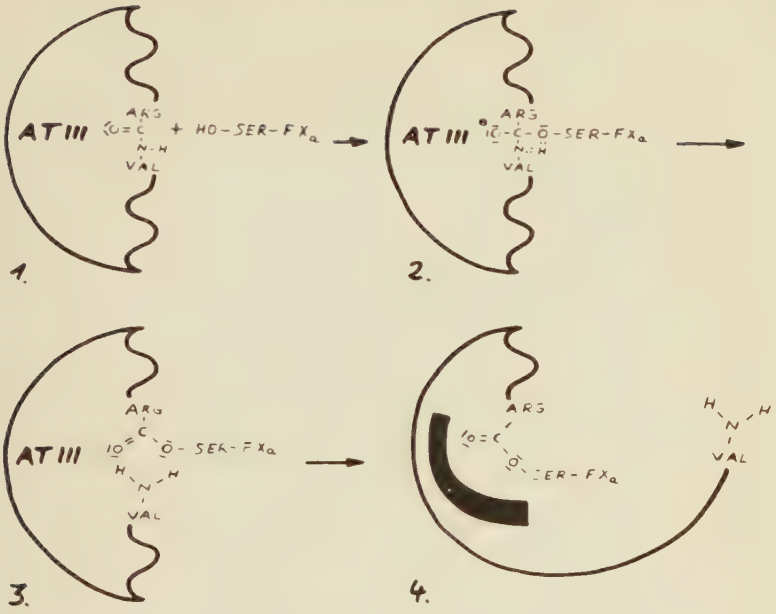


Abb. 32: Aufbau eines hydrophoben Schutzschildes um die Acylbindung nach Abspaltung des ersten hydrolytischen Produktes

Die geschilderten Ergebnisse sind zusammenfassend in Abb. 33 dargestellt:

In Zeile 1 ist zunächst die normale enzymatisch katalysierte Substratspaltung in P_1 und P_2 gezeigt. Nach erfolgter Katalyse steht das Enzym erneut zur Verfügung.

Nach Zugabe des Inhibitors AT III (Zeile 2) wird jedoch kontinuierlich im Sinne einer "dead-end-inhibition" Enzym aus dem System "weggefangen", wobei sich aber zunächst ein noch rückdissoziabler Komplex EI mit der Dissoziationskonstanten K_i ausbildet.

Diese Hemmung ist - wie wir zeigen konnten - initial kompetitiv. Innerhalb kürzester Zeit wechselt sie scheinbar zum non-kompetitiven Typ. Diese Beobachtung ist jedoch virtuell, da durch das ständige Verarmen des Systems an Faktor X_a eine Erniedrigung der Maximalgeschwindigkeit eintritt, die eine non-kompetitive Hemmung vortäuscht.

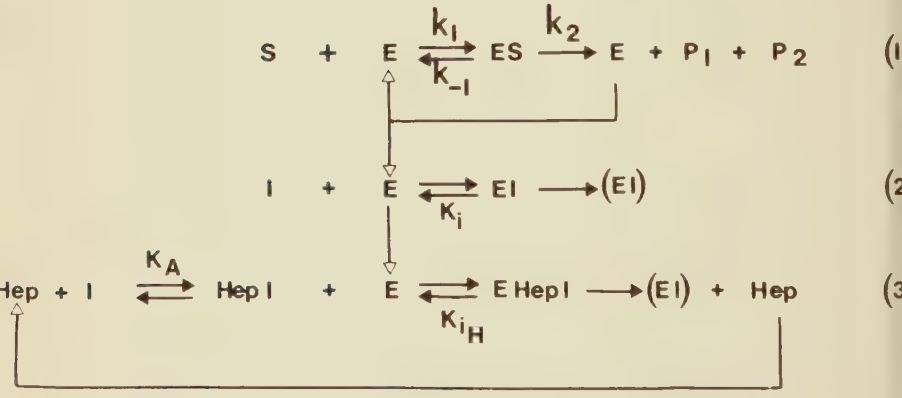


Abb. 33: Wirkungsprinzip von AT III und Heparin

Dies ist jedoch nicht mehr Ausdruck einer unmittelbaren Konkurrenz zwischen AT III und S 2222 um den Faktor X_a.

Nach Zugabe von Heparin (Zeile 3) bilden sich sehr schnell Inhibitor-Heparin-Komplexe mit der Assoziationskonstanten K_A (22). Diese haben eine wesentlich kleinere K_i als der reine Inhibitor, wodurch die Hemmung stark effektiviert wird und der Charakter der Kompetition betont wird. Nach Bildung des

endgültigen - nicht mehr rückdissoziablen - Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI) steht Heparin für eine erneute Katalyse zur Verfügung.

Zusammenfassung

Die kinetischen Konstanten K_M und v_{max} der Faktor X_a-S 2222-Wechselwirkung wurden bestimmt. Beide Größen sind stark kalziumabhängig. Bei einer Kalziumkonzentration von 5 mmol/l ist die Aktivität von F X_a maximal. Im kalziumarmen Milieu wurde eine MICHAELIS-Konstante von 0.422 mmol/l gefunden.

F X_a hat, bezogen auf das Kunstsubstrat S 2222, eine Wechselzahl zwischen 4.000/min und 11.000/min.

F X_a wird durch Antithrombin III konzentrationsabhängig und irreversibel inaktiviert. Diese Inhibition konnte durch Zusatz von Heparin beschleunigt werden, wobei keine Änderung der AT III-Kapazität auftrat.

In der Initialphase der Hemmung von F X_a durch etwa äquimolare Mengen Antithrombin III erfolgt eine schnelle Hemmung mit geringer Halbwertszeit der Enzymrestaktivität, woran sich eine langsamere Inhibition anschließt. Beide Reaktionsabschnitte folgen den Gesetzen einer Reaktion 1. Ordnung.

Durch ein Testsystem, das eine unmittelbare Konkurrenz von Substrat und Inhibitor um das aktive Zentrum des Enzyms ermöglichte, konnte gezeigt werden, daß die Hemmung von Faktor X_a durch Antithrombin III initial kompetitiv ist. Dieses Bild verdeutlichte sich bei Aktivierung des Inhibitors durch Heparin. Hierbei auftretende Vergrößerungen der Maximalgeschwindigkeit konnten auf einen aktivitätssteigernden Effekt von nicht AT III-gebundenem Heparin an Faktor X_a zurückgeführt werden.

Mit Hilfe des graphischen Verfahrens nach DIXON konnte der kompetitive Hemmtyp bestätigt und gezeigt werden, daß die Inhibitorkonstante K_i bei Aktivierung von AT III durch Heparin signifikant verkleinert wird.

7. Literatur

(1) BUDDECKE, E.
Grundriß der Biochemie
Walter de Gruyter, Berlin, New-York, 1977,
5. Auflage, S. 19

(2) RAUEN, H. M.
Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg,
New-York, 1964, 2. Auflage, S. 170-179

(3) HOWELL, W. H., E. HOLT
Two new factors in blood-coagulation-heparin and pro-antithrombin
Am. J. Physiol., 47, 328, 1918

(4) BRINKHOUSE, K. M., H. P. SMITH, E. D. WARNER, W. H. SEEGERS
The inhibition of blood clotting : an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin
Am. J. Physiol., 125, 683, 1939

(5) MONKHOUSE, F. C., E. S. FRANCE, W. H. SEEGERS
Studies on the antithrombin and heparin cofactor activities of a fraction adsorbed from plasma by aluminium hydroxide
Circ. Res., III, 397, 1955

(6) SEEGERS, W. H., E. MARCINIAK
Inhibition of autoprothrombin-C activity with plasma
Nature, 193, 1188, 1962

(7) YIN, E. T., S. WESSLER, P. J. STOLL
Biological properties of the naturally occuring plasma inhibitor to activated factor X
J. Biol. Chem., 246, 3703, 1971

(8) ROSENBERG, R. D., P. S. DAMUS
The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor
J. Biol. Chem., 248, 6490, 1973

(9) DAMUS, P. S., M. HICKS, R. D. ROSENBERG
Anticoagulant action of heparin
Nature, 246, 355, 1973

(10) HIGHSMITH, R. F., R. D. ROSENBERG
The inhibition of human plasmin by human antithrombin-heparin cofactor
J. Biol. Chem., 249, 4335, 1974

(11) YIN, E. T.
Effect of heparin on the neutralization of factor X_a and thrombin by the plasma alpha-2-globulin^{a}inhibitor
Thrombos. Diathes. haemorrh., 33, 43, 1974

(12) PALOS, L. A.
The progressive antithrombine
Haematologia, 8, 455, 1974

(13) ABILDGAARD, U.
Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by antithrombin III, studied by N-terminal analysis
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 20, 207, 1967

(14) DUCKERT, F., I. WITT, L. SVENDSEN
Chromogene Substrate in der Gerinnungsanalytik
Aktuelle Diagnostik, Boehringer, 1976

(15) RICK, W.
Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1977, 5. Auflage, S. 166-167

(16) SCHMIDT-MOHLHEIM, H.
Du BOIS-Reymond Arch. Physiol., 4, 33. 1880
zitiert nach (22)

(17) GLEY, E., V. PACHON
Arch. Physiol., 27, 711, 1895
zitiert nach (22)

(18) GLEY, E., V. PACHON
C. R. Soc. Biol. (Paris), 47, 741, 1895
zitiert nach (22)

(19) DELEZENNE, C.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 122, 1072, 1896
zitiert nach (22)

(20) McLEAN, J.
The thromboplastic action of cephalin
Am. J. Physiol., 41, 250, 1916

(21) HOWELL, W. H.
The purification of heparin and its presence in blood
Am. J. Physiol., 71, 553, 1924 - 1925

(22) TROBISCH, H., K.-H. KLASING
Zur Biochemie und Pharmakologie des Heparins
Deutsche Apotheker Zeitung, 34, 1587, 1980

(23) JACKSON, C. M., D. J. HANAHAN
Studies on bovine factor X. Characterization of purified factor X. Observations on some alterationes in zone electrophoretic and cromatographic behaviour occuring during purification
Biochemistry, 7, 4506, 1968

(24) JACKSON, C. M.
Characterization of two glycoprotein variants of bovine factor X and demonstration that the factor X zymogen contains two polypeptide-chains
Biochemistry, 11, 4873, 1972

(25) FUJIKAVA, K., M. E. LEGAZ, E. W. DAVIE
Bovine factors X_1 and X_2. Isolation and characterization
Biochemistry, 11, 4882, 1972

(26) DI SCIPIO, R. G., M. A. HERMODSON, S. G. YATES, E. W. DAVIE
A comparison of human prothrombin, factors IX (Christmas-factor), factor X (Stuart-factor), and protein S
Biochemistry, 16, 698, 1977

(27) KRAUT, J.
Serine proteases : structure and mechanism of catalysis
J.: Ann. Rev. Biochem., 46, 331, 1977

(28) TROBISCH, H., K.-H. KLASING
Die Bedeutung chromogener Peptidsubstrate für die Gerinnungsdiagnostik
Med. Lab., 33, 183, 1980

(29) TROBISCH, H., K.-H. KLASING, Th. WOST, O. RICHTER
Zum Mechanismus der Inaktivierung des Faktors X_a durch das progressive Antithrombin (AT III) und den AT III-Heparin-Komplex
Tagung der deutschen Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung, Wien 1980

(30) KURACHI, K., K. FUJIKAVA, G. SCHMER, E. W. DAVIE
Inhibition of bovine factor IX_a and factor $X_{\alpha,\beta}$ by AT III
Biochemistry, 15, 373, 1976

(31) AOKI, N., M. IGARASHI
Antithrombin III. Its physicochemical properties and pathophysiological significance
Acta haem. jap., 36, 472, 1973

(32) JORPES, J. E.
The chemistry of heparin
Biochem. J., 29, 1817, 1935

(33) WOLFROM, M. L., G. H. S. THOMAS
Carboxyl-reduced heparin
J. Org. Chem., 26, 2160, 1961

(34) ROSENBERG, R. D.
Structural requirements for heparin's anti-coagulant function
Int. Symposium and workshop Structure, Biochemistry and Function of Antithrombin III
Homburg/Saar, 1979

(35) THUNBERG, L., U. LINDAHL, A. TENGBLAD, T. C. LAURENT, C. JACKSON
On the molecular wheight-dependence of the anticoagulant activity of heparin
Biochem. J., 181, 241, 1979

(36) ERLANGER, B. F., N. KOWOSKY, W. COHEN
Arch. Biochem. Biophys., 95, 271, 1961
zitiert nach (28)

(37) S 2222 - Data Sheet
KABI - Diagnostika, Stockholm

(38) ORTHNER, C. L., D. P. KOSOW
The effect of metol ions on the amidolytic activity of human factor X_a
Arch. Biochem. Biophys., 185, 400, 1978

(39) KOSOW, D. P.
Purification and activation of human factor X : cooperative effect of Ca^{++} on the activation reaction
Thromb. Res., 9, 565, 1976

(40) AURELL, L., P. FRIBERGER, G. KARLSSON, G. CLAESON
A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for factor X_a
Throm. Res., 11, 595, 1977

(41) ØSTERUD, B., M. MILLER-ANDERSSON, U. ABILDGAARD, H. PRYDZ
The effect of antithrombin III on the activity of the coagulation-factors VII, IX, X
Thromb. Haemostas. (Stuttgart), 35, 295, 1976

(42) STORZEBECHER, J.
Role of heparin in the interaction of serine proteinases with antithrombin III
Acta biol. med. germ., 36, 1893, 1977

(43) GRIFFITH, M. J., H. S. KINGDON, R. L. LUNDBLAD
Hydrolysis of N-alpha-benzoyl-L-phenyl-alanyl-L-volyl-L-arginine-p-nitro-anilide by human alpha-thrombin in the presence of heparin
Thromb. Res., 17, 83, 1980

(44) DANIELSSON, Å. I. BJÖRK
The binding of low-affinity heparin and high-affinity heparin to antithrombin
Eur. J. Biochem., 90, 7, 1978

(45) EINARSON, R.
The increase in human antithrombin III tryptophan fluorescence produced by heparin
Biochim. Biophys. Acta, 534, 165, 1978

(46) EINARSON, R.
The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate, heparin, salicylate and caprylate by human antithrombin III
Biochim. Biophys. Acta, 446, 124, 1976

(47) BJÖRK, I., B. NORDENMANN
Acceleration of the reaction between thrombin and antithrombin III by non stoichiometric amounts of heparin
Eur. J. Biochem., 68, 507, 1976

(48) LI, E. H. H., J. W. FENTON, R. D. FEINMAN
The role of heparin in the thrombin -antithrombin III-reaction
Arch. Biochem. Biophys., 175, 153, 1976

(49) CARLSTRÖM, A. S., K. LIEDEN, I. BJÖRK
Decreased binding of heparin to antithrombin, following the interaction between antithrombin and thrombin
Thromb. Res., 11, 785, 1977

(50) NORDENMANN, B., Å, DANIELSSON, I. BJÖRK
The binding of low-affinity and high-affinity heparin to antithrombin
Eur. J. Biochem., 90, 1, 1978

(51) ØDEGÅRD, O. R., U. ABILDGAARD, M. LIE, M. MILLER-ANDERSSON
Inactivation of bovine and human thrombin and factor X_a by antithrombin III, studied with amidolytic methods
Thromb. Res., 11, 205, 1977

(52) CHRISTENSEN, H. N., G. A. PALMER
Lehrprogramm Enzymkinetik
Verlag Chemie - Physik Verlag, S. 75

(53) STORZEBECHER, J.
Untersuchungen zur Reaktionsweise des Heparins
Folia Haematol., Leipzig, 104, 731, 1977

(54) TROBISCH, H.
Persönliche Mitteilung 1980

(55) WOST, TH.
Heparin- und Antithrombinwechselwirkung
MEDICA, Düsseldorf, 1980

(56) KLASING, K.-H., H. TROBISCH
The mechanism of factor X_a - inactivation by the antithrombin III-heparin-complex
Int. Symposium and workshop, Structure, Biochemistry and Function of Antithrombin III, Homburg/Saar, 1979

(57) TROBISCH, H.
Isolierung und biochemische Charakterisierung des Gerinnungsfaktors VIII
Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn, 1978, 1. Auflage, S. 4 - 6

(58) RUSTIGE, H.
Persönliche Mitteilung 1981

(59) SCHMITZ, L., H. TROBISCH
Thrombose-induzierende und anaphylaktoide Nebenwirkungen von PPSB-Präparationen
Die Medizinische Verlagsgemeinschaft, Marburg/Lahn, 1980, 1. Auflage, S. 7

(60) MEYER-BERTENRATH, J. G.
Blutgerinnung und Fibrinolyse
Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1975, 3. Auflage, S. 18 - 19

(61) BERGMEYER, H. U.
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1974
3. Auflage, S. 192 - 193, S. 334

(62) LINEWEAVER, H., D. BURK
The determination of enzyme dissociation constants
J. Amer. chem. Soc., 56, 658, 1934
zitiert nach (2)

(63) DIXON, M.
The determination of enzyme inhibitor constants
Biochem. J., 55, 170, 1953
zitiert nach (61)

(64) ESNOOF, M. P.
The prothrombin-converting complex
Biochem. Soc. Trans., 5, 1244, 1977

(65) BLASKŌ, G., R. MACHOVICH
Decreased heparin sensitivity of cyclohexanedione-modified factor X_a
Thromb. Haemostas. (Stuttgart), 42, 556, 1979

(66) MACHOVICH, R., E. REGOECZI, M. W. C. HATTON
Altered inactivation of trinitrophenylated thrombin by antithrombin III in the presence of heparin
Thromb. Res., 17, 383, 1980

Lebenslauf

Am 17. Februar 1957 wurde ich als Sohn des Diplom-Chemikers Dr. Willi Wüst und seiner Ehefrau Ruth in Pirmasens geboren.

Nach der Grundschule besuchte ich zunächst das Altsprachliche Gymnasium in Pirmasens und wechselte dann im Jahre 1970 an das Schloßgymnasium Benrath, Mathematisch-Naturwissenschaftlicher Zweig, über. Die Reifeprüfung legte ich im Frühjahr 1976 ab.

Seit dem Wintersemester 1976 studiere ich Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. 1978 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, 1979 den 1. Teil und 1981 den 2. Teil der Ärztlichen Prüfung.

Zur Zeit absolviere ich das Praktische Jahr am Evangelischen Krankenhaus Mülheim mit Wahlfach Gynäkologie.

Thomas Wüst